T. 260

MÉMOIRES
DU
MUSÉUM NATIONAL
D'HISTOIRE NATURELLE
NOUVELLE SÉRIE
Série A, Zoologie
TOME V
FASCICULE 2

RENÉ TIXIER

SUR QUELQUES PIGMENTS TÉTRAPYRROLIQUES PROVENANT D'ANIMAUX MARINS

PARIS
ÉDITIONS DU MUSÉUM
36, rue Geoffroy-Saint-Hilaire (V^e^)
1952

Source MNHN, Paris

Source MNHN, Paris

Le résumé

[illegible]

MÉMOIRES DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Série A. Zoologie. — Tome V, fascicule 2. — Pages 41 à 132.

SUR QUELQUES PIGMENTS TÉTRAPYRROLIQUES PROVENANT D'ANIMAUX MARINS

par René TIXIER
Docteur en Pharmacie

Le présent travail a été effectué tant au Laboratoire de Chimie Organique du Muséum National d'Histoire naturelle de Paris qu'à l'Institut de Biologie physico-chimique (service de Biochimie) de Paris.

Avant d'aborder notre exposé, nous voulons remercier tout particulièrement M. E. Aubel, Professeur de Chimie biologique de la Faculté des Sciences de Paris, pour le bienveillant intérêt qu'il nous a témoigné et pour les encouragements qu'il nous a prodigués.

Nous adressons nos respectueux remerciements à M. C. Sannié, Professeur du Laboratoire de Chimie organique du Muséum, pour l'aide favorable qu'il nous a accordée au cours de la réalisation de ce travail.

A M. E. Lederer, Maître de Recherches au C.N.R.S., nous exprimons notre très vive gratitude pour la constante sollicitude avec laquelle il a suivi et orienté nos recherches.

Nous remercions également M. M. Frèrejacque, sous-Directeur, pour son aimable accueil au Muséum.

A Mme Y. Khouvine, Maître de Recherches au C.N.R.S., nous sommes heureux d'adresser nos remerciements pour l'amabilité avec laquelle elle a mis à notre disposition le spectrophotomètre de Beckman de son service.

Nous désirons remercier M. P. Girard, Directeur de l'Institut de Biologie physico-chimique, d'avoir bien voulu nous accepter dans ses Laboratoires.

Nous voulons témoigner notre reconnaissance à tous les chercheurs du Service de biochimie pour le cordial accueil qu'ils nous ont réservé.

A MM. M. Prenant, E. Aubel et R. Wurmser, Professeurs de la Faculté des Sciences, nous exprimons notre respectueuse gratitude pour avoir accepté de faire partie de notre jury de Thèse.

BIBL. DU MUSEUM D'HIST. NATUR.

Source MNHN, Paris

INTRODUCTION

Le nombre imposant de travaux publiés chaque année sur les chromoprotéides porphyriniques (hémoglobines, cytochromes, peroxydases, catalases, cruorines) témoigne de l'importance accordée par les biologistes et les chimistes au rôle essentiel joué par ces pigments dans les phénomènes vitaux. Les propriétés biologiques des chromoprotéides respiratoires sont dues à leurs groupements prosthétiques, constitués par une porphyrine liée à un atome de fer bivalent, tandis que leur spécificité est assurée par le substrat protéique. Le catabolisme de l'hémoglobine, en particulier le mécanisme biochimique de l'ouverture du cycle porphyrinique avec formation de pigments biliaires, fait l'objet de nombreuses recherches, résumées dans l'exposé de Cl. Lienecq (**1**). En 1945, l'emploi d'éléments marqués permet à K. Bloch, D. Shemin et D. Rittenberg (**2, 3, 4**) d'aborder avec succès l'étude de la formation *in vivo* de l'hémoglobine, et de montrer que la synthèse du noyau porphyrinique s'effectue à partir de substances très simples telles que le glycocolle et l'acide acétique. Pendant longtemps on a pensé que les pigments biliaires provenaient à peu près exclusivement de la dégradation de l'hémoglobine des érythrocytes mûrs. Or les recherches de J. M. London, R. West, D. Shemin et D. Rittenberg (**5, 6, 7**) indiquent que chez l'homme normal au moins 11 pour 100 de la stercobiline, et dans les cas de porphyrie congénitale au moins 31 pour 100, proviennent d'une source autre que celle de l'hémoglobine des érythrocytes. M. Grinstein et ses collaborateurs (**8**) pensent que la coproporphyrine I, l'uroporphyrine I, la protoporphyrine IX de l'hémine et la stercobiline ont un précurseur pyrrolique commun ; en outre ils suggèrent (**9**) que la coproporphyrine III pourrait être directement synthétisée par l'organisme et se trouver à l'origine de la protoporphyrine IX.

Cependant, malgré les apports nouveaux, le mécanisme de la biosynthèse du noyau pyrrolique, du cycle prophyrinique et des divers types de porphyrines n'est pas encore élucidé ; il fait l'objet d'un grand nombre de théories qui se trouvent exposées dans l'étude critique de P. Maitland (**10**). La présence dans les urines de malades, atteints de porphyrie aiguë, d'un dipyrrylméthane (porphobilinogène), pouvant, en milieu chlorhydrique, donner naissance à un pigment biliaire tétrapyrrolique (porphobiline) et à une porphyrine (uroporphyrine III) (**11**), pourrait également servir à élucider le mécanisme de l'accouplement des noyaux pyrroliques. Les recherches

Source MNHN, Paris

sur la biosynthèse de la prodigiosine (**12**) et sur les pigments pyrroliques des Légumineuses (**13**) sont également d'un grand intérêt.

Bien que la majorité des publications concerne l'Homme et les Vertébrés supérieurs, nous pensons que des recherches effectuées sur les Invertébrés pourraient conduire à une connaissance plus approfondie de la biochimie des pigments pyrroliques et apporter des éléments nouveaux sur leur catabolisme ou leur biosynthèse. Alors que les chromoprotéides respiratoires (chlorocruorines, érythrocruorines, hémoglobines) des Invertébrés sont le sujet de travaux précis, l'étude des porphyrines et surtout celle des pigments biliaires sont, dans la plupart des cas, très rudimentaires : il suffit, par exemple, qu'un pigment vert donne la réaction de Gmelin pour qu'il soit assimilé à la biliverdine. Nous avons eu l'occasion d'observer le pigment du Corail bleu (*Heliopora cærulea*) et de constater que ce biochrome, dont les propriétés étaient identiques à celles de la biliverdine, en était cependant différent dans son comportement chromatographique sur alumine (**14**, **15**). De même, ainsi que nous l'exposerons ultérieurement, le pigment bleu des coquilles de *Turbo*, bien qu'appartenant à la classe des verdines, possède une constitution chimique distincte de celle de la biliverdine et de la coproglaucobiline. Les pigments des coquilles d'*Haliotis* constituent également une nouvelle classe de bilirubinoïdes à propriétés particulières.

L'origine des pigments tétrapyrroliques des Invertébrés, dont le sang renferme de l'hémocyanine (chromoprotéide cuivrique non porphyrinique), est toujours une énigme. Ch. Dhéré et C. Baumeler (**16**, **17**) pensent que le pigment rouge d'*Haliotis rufescens* provient soit de la chlorophylle alimentaire, soit du cytochrome (ou de tout autre corps à noyau porphyrinique). Un aperçu sur la présence de composés ferroporphyriniques et de déshydrogénase succinique, chez les animaux marins à sang hémocyanique, est donné par E. G. Ball et B. Meyerhof (**18**). Nous nous demandons si l'origine des pigments des coquilles de Mollusques ne devrait pas être recherchée dans des phénomènes de biosynthèse soit totale, soit partielle à partir d'éléments pyrroliques simples, provenant de la dégradation des phycochromoprotéides absorbés par ces Invertébrés. Peut-être sommes-nous en présence des vestiges d'un système de biosynthèse actuellement rudimentaire et sans utilité pour l'animal.

PIGMENTS PYRROLIQUES DES INVERTÉBRÉS

Les données sur la répartition, la constitution chimique et le rôle biologique des pigments pyrroliques d'Invertébrés sont, non seulement fragmentaires, mais souvent anciennes et imprécises. L'étude des chromoprotéides respiratoires des Invertébrés sortant du cadre du présent travail, nous renverrons à l'ouvrage de R. Lemberg et J. W. Legge (**19**) qui résume l'ensemble de nos connaissances sur les pigments pyrroliques. Signalons également les

Source : MNHN, Paris

exposés généraux de E. Lederer (20) sur les pigments d'Invertébrés et de D. Fox (21) sur ceux des Coelentérés.

La présence de pigments pyrroliques chez les **Coelentérés** est d'abord signalée par H. N. Moseley (1877), puis par C. A. Mac Munn (1885). Ce dernier pense que le pigment (polyérythrine), trouvé par H. N. Moseley (22) chez de nombreux Madrépores, chez diverses espèces d'Actinies et chez les Méduses *Cassiopeia* et *Ithizosloma*, correspond à une hématoporphyrine. Il montre également l'existence de porphyrines chez les Coraux *Flabellum variabilis* et *Fungia symmetrica* (23) et d'une biliverdine, localisée sous l'ectoderme et à la base du pied, chez *Actinia equina* et *Tealia felina* (24). Le pigment rouge ou violet de l'Anémone de mer *Calliactis effœta* (= *Sagartia parasitica*), étudié par C. A. Mac Munn, puis par M. Abeloos et G. Teissier (25), est obtenu à l'état cristallisé (calliactine) par E. Lederer, G. Teissier et G. Huttrer (26). Sa formule élémentaire $C_{21}H_{20}O_5N_4$ et diverses propriétés font penser à un pigment pyrrolique. Il semble que le pigment rouge de *Cerianthus membranaceus*, étudié par C. Fr. Krukenberg (27), soit voisin de la calliactine, malgré les différences spectroscopiques (C. A. Mac Munn). Le pigment du squelette calcaire d'*Heliopora cærulea* Pall. (Corail bleu) est un bilirubinoïde, dont les propriétés physico-chimiques sont entièrement comparables à celles de la biliverdine (R. Tixier) (28). Ce pigment, que nous dénommons hélioporobiline, se distingue cependant de la biliverdine par son comportement chromatographique.

Aucun aperçu nouveau sur les pigments pyrroliques des **Echinodermes** ne précise le travail de C. A. Mac Munn sur les porphyrines des Étoiles de mer brunes.

Avant d'aborder l'étude des pigments pyrroliques des **Vers**, rappelons que les chlorocruorines ont un groupement prosthétique, la spirographis-hémine, qui renferme une porphyrine particulière, isolée par M. Fox (29), puis analysée (30) et synthétisée (31) par H. Fischer et ses collaborateurs. La constitution chimique de la spirographis-porphyrine ne diffère de celle de la protoporphyrine que par l'existence d'un groupement aldéhydique à la place d'un radical vinylique. Signalons également le travail histochimique de Cl. Bloch-Raphael (32) sur la localisation, la formation et la destruction de l'hémoglobine chez les Annélides polychètes.

Les diverses recherches, effectuées sur la porphyrine d'*Eisenia fœtida* par W. Hausmann (33) et H. Fischer (34), ne sont pas arrivées à une conclusion définitive. Par contre, la présence d'une protoporphyrine est mise en évidence dans les téguments de *Lumbricus terrestris* (35) et des cysticerques de *Tænia solium* (38). C. Spiess (37) signale l'existence de pigments biliaires chez *Hirudo medicinalis* et G. Georghiu (38) chez *Protoclepsis lesselata*. La pontobdelline, pigment tégumentaire bleu-verdâtre d'une Hirudinée *Pontobdella*, présente, d'après M. Abeloos (39), les caractères d'une biliverdine.

A côté de ces divers produits du catabolisme de l'hémoglobine existent,

Source : MNHN, Paris

chez les Vers, d'autres pigments pyrroliques d'origine chlorophyllienne. Une vue d'ensemble sur ces pigments accompagne l'exposé de Ch. Dhéné et M. Fontaine (**40**) sur les propriétés chimiques et spectroscopiques de la bonelline, pigment vert foncé de la femelle du Géphyrien *Bonellia viridis*. Obtenue à l'état pur par E. Lederer (**41**), la bonelline répond à la formule élémentaire $C_{31}H_{36}O_4N_4$; bien que ses spectres soient analogues à ceux d'une mésopyrrochlorine, elle se différencie de cette porphyrine par la présence de deux oxygènes supplémentaires dans sa molécule. De même la chétoptérine, pigment vert foncé de l'épithélium intestinal du Chétoptère (Annélide polychète tubicole) étudié par M. Romieu (**42**, **43**), est un produit de dégradation des chlorophylles, probablement une phéophorbide. Le pigment vert du tégument de *Phyllodoce viridis*, dénommé phyllodocine par C. A. Mac Munn (**44**), se comporte comme un indicateur de pH (**25**) ; celui d'*Eulalia viridis*, que C. A. Mac Munn croit identique à la phyllodocine, en est, selon E. Lederer (**20**), distinct. Enfin, la thalassémine, pigment vert pomme de *Thalassema lankesteri*, diffère de la bonelline par ses propriétés spectroscopiques (**45**).

Chez les **Crustacés** la présence d'une biliverdine est signalée par H. C. Bradley (**46**) dans la glande digestive de l'Écrevisse américaine (*Cambarus*) et par E. Lederer (**20**) dans les racines du parasite *Pellogaster paguri*.

Chez les **Insectes**, H. Fischer et H. Fink (**47**) trouvent de la protoporphyrine et de la coproporphyrine dans les excréments de chenilles de mites. Les pigments biliaires, décelés chez les Lépidoptères et les Orthoptères, sont à l'état de chromoprotéides. C'est ainsi que G. von Linden (**48**) signale dans les ailes de Vanesses un chromoprotéide rouge, dont le groupement prosthétique donne la réaction de Gmelin, tandis que H. Wieland et A. Tartier (**49**) isolent des ailes de plusieurs espèces de Papillons (*Pteris brassicæ*, *P. rapæ*, *P. napi*, *Gonepteryx rhamni*, *Calopsilia rurinea* et *C. salira*) un chromoprotéide bleu, soluble dans l'eau ; ce dernier donne par hydrolyse acide un pigment biliaire : la ptérobiline, dont la formule élémentaire s'accorde avec celles d'une biliverdine ou d'une glaucobiline : il s'agit peut-être d'une biliverdine γ. H. Junge (**50**) étudie les chromoprotéides (insectoverdines) de l'épiderme de diverses espèces d'Orthoptères et des chenilles de *Sphinx ligustri*, ainsi que celui de l'hémolymphe de *Dixippus morosus*. La couleur verte est due à la présence de deux chromoprotéides, dont les groupements prosthétiques sont jaunes (caroténoïdes) et bleu (glaucobiline) ; cette glaucobiline est différente à la fois de la glaucobiline IXα, de la biliverdine IXα et de la ptérobiline. Des chromoprotéides rouge et bleu, ressemblant aux phycochromoprotéides, sont trouvés par S. Okay dans le tégument vert de *Mantis* (**51**). Chez les Coléoptères, A. Porta (**52**) signale l'excrétion d'un pigment voisin de l'urobiline par les Coccinelles. Chez les Diptères, A. Gomas (**53**) mentionne la présence de biliverdine dans les larves de *Chironomus* et chez les Hémiptères hématophages, en particulier chez *Rhodnius*, V. B. Wigglesworth (**54**) étudie la transformation de l'hémo-

Source : MNHN, Paris

globine ingérée, dont une partie se trouve excrétée à l'état de biliverdine et d'urobiline.

L'étude des porphyrines et des pigments biliaires des coquilles de **Mollusques** faisant l'objet du présent travail, nous pensons préférable d'en donner ultérieurement un historique détaillé et de ne citer pour l'instant que les recherches effectuées sur les pigments pyrroliques des Limaces et des Aplysies. Ch. Dhéré et G. Baumeler (**55**) confirment la présence d'une porphyrine dans le derme d'*Arion empiricorum*. Alors que L. Dor (**56**) considère le pigment tégumentaire d'*Arion rufus* comme un carbonate d'urobiline, Ch. Dhéré et G. Baumeler (**57, 58**) le comparent à la bilirubine et le nomment rufine. Le pigment violet pourpre des sécrétions d'Aplysies et limaces de mer (*Aplysia punctata, A. depilans, A. limacina*) fait l'objet de nombreuses recherches exposées dans les travaux de M. Fontaine et A. Raffy (**59**) et de E. Lederer (**60**). Ce dernier décèle la présence de deux chromoprotéides pouvant être séparés, soit par relargage, soit par chromatographie sur alumine. Les groupements prosthétiques de ces chromoprotéides sont facilement dissociés du support protéique soit par l'alcool butylique, soit par acidification et séparés par chromatographie sur carbonate de calcium. E. Lederer conserve le nom d'aplysiovioline au pigment violet et nomme aplysiorhodine le pigment rouge. Ces deux pigments ont des propriétés voisines de celles de la mésobilivioline, de la pseudomésobilivioline et de la mésobilirhodine. Dans un travail préliminaire avec E. Lederer nous avons chromatographié sur alumine les esters méthyliques des pigments d'Aplysies et séparé trois bilirubinoïdes : un violet (aplysiovioline), un rouge (aplysiorhodine) et un brun analogue à une urobiline.

Le seul travail concernant les **Tuniciers** est celui de D. A. Webb (**61**) sur les Ascidies, dont le « vanadium chromogène » est peut-être apparenté aux pigments biliaires.

D'après cet exposé il apparaît que si la plupart des porphyrines des Invertébrés sont, semble-t-il, identiques aux porphyrines des Vertébrés, il n'en est pas de même pour les pigments biliaires, dont l'étude est quelque peu approfondie : par exemple, la ptérobiline, l'hélioporobiline, la glaucobiline des chromoprotéides d'Orthoptères, les bilirubinoïdes de Mollusques... Nous sommes persuadés qu'une connaissance approfondie des pigments pyrroliques des Invertébrés doit apporter de nombreuses surprises sur la constitution chimique de ces biochromes et montrer l'existence d'isomères nouveaux. L'emploi d'éléments marqués pourrait dans bien des cas permettre de déterminer l'origine, jusqu'ici obscure, de ces pigments. Malheureusement l'étude de ces derniers est presque toujours ingrate et décevante ; il est, en effet, difficile de trouver le matériel désiré en quantité suffisante ; la teneur en pigments est souvent très faible et leur purification rendue difficile par leur instabilité.

Source : MNHN, Paris

TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Depuis quelques années, les anciennes techniques de séparation des pigments pyrroliques, longues et imparfaites, font place à l'analyse chromatographique, dont l'emploi non seulement rend plus aisé l'isolement et la purification de ces biochromes, mais également apporte une plus grande précision dans leur étude. L'emploi de l'analyse chromatographique permet en effet de séparer des pigments isomères, d'isoler de nouveaux biochromes, d'élucider le mécanisme de réactions extrêmement complexes, comme par exemple celle de Gmelin pour les pigments biliaires.

Dans le domaine des **porphyrines**, les techniques d'adsorption sont utilisées soit pour concentrer ces pigments et en effectuer une purification grossière, soit pour séparer leurs esters méthyliques et les obtenir à l'état pur. En 1936, J. Waldenström (**62**) propose une technique de chromatographie sur alumine d'urines porphyriniques, afin d'en étudier l'uroporphyrine et les pigments rouges pathologiques. La même année, H. J. Hoffmann (**63**), purifiant par adsorption sur talc l'ester méthylique d'une uroporphyrine de point de fusion 286°, en isole une uroporphyrine I (PF. 302°) et une uroporphyrine III (PF. 261°), identique à celle de J. Waldenström (**64, 65**). H. Fischer et H. J. Hofmann (**66**) expliquent ainsi les points de fusion anormaux des diverses uroporphyrines naturelles par la présence simultanée des isomères I et III. Ces auteurs identifient également par cette méthode la conchoporphyrine avec l'uroporphyrine I.

C. Watson et ses collaborateurs mettent au point l'analyse chromatographique des esters méthyliques de la protoporphyrine (**67, 68, 69**), des coproporphyrines (**70**) et des uroporphyrines (**71, 72**) en employant comme adsorbant soit le carbonate de calcium, soit l'alumine. Ces auteurs pensent que l'uroporphyrine III de J. Waldenström est encore un mélange d'uroporphyrine I et d'une porphyrine à sept groupements carboxyles. O. Volker (**73**) utilise la chromatographie sur alumine, dans son étude sur les porphyrines des plumes des Oiseaux, pour séparer l'ester méthylique de la coproporphyrine III. Personnellement nous employons la technique chromatographique pour purifier et identifier les porphyrines des coquilles de Mollusques (**74**) et les porphyrines de l'ambre gris (**75**). Signalons également l'emploi de la terre d'Infusoires par W. Grotepass et A. Defalque (**76**) et du Kieselguhr par C. Rimington (**77**).

A ces diverses techniques d'adsorption s'ajoute celle de la chromatographie de partage sur papier, adaptée à l'étude des porphyrines par R. E. H. Nicholas et C. Rimington (**78, 79**). Les meilleurs résultats sont obtenus en employant le système lutidine - eau en atmosphère ammoniacale. L'emplacement des porphyrines sur la bande de papier dépend du nombre des groupes carboxyliques libres, le Rf diminuant quand le nombre des fonctions acides augmente. R. E. H. Nicholas et A. Comfort (**80**) viennent d'appli-

Source : MNHN, Paris

quer cette méthode à l'étude des porphyrines des coquilles de divers Mollusques et de montrer qu'une coproporphyrine accompagne l'uroporphyrine dans certaines espèces de *Pinctada* (*Pteria*). R. Mac Swiney, R. E. H. Nicholas et F. T. G. Prunty (**81**) l'emploient également dans l'étude de cas de porphyrie aiguë et décèlent l'existence de porphyrines dont le nombre de groupements acides est différent de celui des porphyrines connues.

Dans le domaine des **pigments biliaires**, l'analyse chromatographique permet à W. Siedel (**82**) de montrer que la mésobilivioline IXα était en réalité un mélange de deux pigments isomères : l'un pour lequel cet auteur conserve le terme de mésobilivioline, l'autre qu'il dénomme mésobilirhodine. W. Siedel étudie également l'isomérisation progressive de la mésobilivioline XIIIα en φ mésobilivioline XIIIα (**83**), sépare les bilirubinoïdes correspondant aux diverses phases de la réaction de Gmelin (mésobilipurpurines et mésocholétéline) (**84**, **85**) et purifie la mésobilifuscine (**86**). De même H. Fischer (**87**) utilise l'adsorption chromatographique pour purifier les esters méthyliques des biliverdines IXα et IIIα lors de la synthèse de ces pigments. Au cours de recherches antérieures (**88**, **89**, **28**), nous indiquons une méthode de purification de la biliverdine IXα et de son isolement à partir des coquilles d'œufs d'Émeu. La possibilité d'une séparation de la bilirubine par chromatographie est étudiée par T. K. With (**90**). E. Lederer (**60**) utilise l'adsorption sur alumine, pour séparer les chromoprotéides des sécrétions des Aplysies, et sur carbonate de calcium, pour isoler les groupements prosthétiques de ces pigments (aplysiovioline et aplysiorhodine). Signalons également le travail de E. Lederer (**41**) sur le pigment vert de *Bonellia viridis* et celui de H. Willstaedt (**91**) sur les biochromes verts des arêtes de *Belone belone* (Orphie) et de *Zoarces viviparus*.

Au cours du présent travail nous faisons constamment usage de l'analyse chromatographique, tant pour l'isolement des porphyrines que pour celui des pigments biliaires.

Dans la première partie de cet exposé nous étudions les porphyrines des coquilles de Mollusques appartenant aux genres *Pteria*, *Clanculus* et *Trochus*, puis les pigments biliaires des tests de *Turbo* et d'*Haliotis*.

Dans la deuxième partie nous exposons les recherches effectuées sur les porphyrines de l'ambre gris, concrétion intestinale du Cachalot (*Physeter macrocephalus*).

Source MNHN, Paris

TECHNIQUES PERSONNELLES

Les techniques utilisées au cours de ce travail pour l'extraction, la purification et l'identification des pigments porphyriniques ou biliaires (soit à partir de l'ambre gris, soit à partir des coquilles de Mollusques) étant extrêmement voisines, il nous semble intéressant de les résumer en un chapitre commun.

I. — EXTRACTION ET ESTÉRIFICATION DES PIGMENTS

Les porphyrines et les pigments biliaires sont extraits par de l'alcool méthylique chlorhydrique à 10 ou 12 pour 100, préparé par passage de gaz chlorhydrique dans le méthanol. Il est ainsi possible de dissoudre les pigments, de les estérifier, puis de les faire passer dans un solvant organique tel que le chloroforme. Cette méthode rend possible l'isolement des biochromes qui, directement, ne peuvent être dissous dans les solvants organiques.

C'est ainsi que les porphyrines de l'ambre gris ne peuvent être extraites en totalité ni par les solutions alcalines ou acides, ni à l'aide des solvants organiques ; seul, l'usage de l'alcool méthylique chlorhydrique permet de dissoudre l'ensemble des porphyrines. Après distillation de la liqueur alcoolique sous vide, les pigments sont repris par le chloroforme. L'extraction directe des porphyrines de la solution alcoolique par le chloroforme donne en effet naissance à des émulsions difficiles à détruire.

De même, dans les recherches antérieures sur les pigments des coquilles de Mollusques (*Turbo*, *Trochus*, *Haliotis*), il avait été constaté que ces biochromes présentaient les réactions des bilirubinoïdes, mais qu'ils étaient insolubles dans les solvants organiques. Les coquilles étaient attaquées par des solutions acides diluées et les pigments, dissous dans les liqueurs acides, ne pouvaient être enlevés par les solvants habituels des bilirubinoïdes. L'emploi de l'alcool méthylique chlorhydrique permet de détruire le substrat calcaire, de dissoudre les pigments, de les estérifier, puis de les extraire par le chloroforme.

Cette méthode semble assez générale, c'est ainsi que le pigment (héliporobiline) du Corail bleu (*Heliopora cærulea*) (**14**, **15**) ne peut être dissous par un solvant organique qu'après traitement par l'alcool méthylique chlorhydrique. Dans les cas où les pigments sont insolubles dans l'eau acide

Source MNHN, Paris

(biliverdine des coquilles d'œufs d'Émeu (**89**), pigment bleu d'*Heliopora*), il est possible d'attaquer le substrat calcaire par de l'eau chlorhydrique, puis de reprendre le résidu par le méthanol chlorhydrique. Ce procédé n'est cependant pas universel ; ainsi, la biliverdine des coquilles d'œufs d'Émeu existe sous deux formes : l'une fixée au calcaire, qui est dissoute par l'alcool méthylique chlorhydrique, l'autre à l'état de chromoprotéide, qui ne peut être séparée par ce moyen.

Pour que l'estérification des porphyrines et des pigments biliaires par l'alcool méthylique chlorhydrique soit complète, la solution nettement acide est laissée 24 heures à l'obscurité (en général après 6 heures l'estérification est terminée). La durée de l'estérification peut être abrégée en portant la solution à l'ébullition pendant 1/4 ou ½ heure.

Les porphyrines et les pigments biliaires sont en général extraits directement par le chloroforme ou l'éther à partir de la solution alcoolique diluée avec de l'eau distillée. Cependant dans certains cas les pigments ne peuvent être enlevés par le chloroforme qu'après neutralisation de la liqueur acide par du bicarbonate de sodium (pigments des coquilles de divers *Turbo* et d'*Haliotis cracherodii*), ces pigments étant d'autant plus solubles dans l'eau que la liqueur est plus acide.

Les porphyrines et les pigments biliaires sont des éléments amphotères, possédant dans leur molécule à la fois des fonctions acides et basiques. Par action de l'alcool méthylique chlorhydrique, les radicaux acides sont estérifiés et les fonctions basiques salifiées (chlorhydrates d'esters méthyliques). Les chlorhydrates sont décomposés par lavages des solutions chloroformiques à l'aide d'une solution de carbonate de sodium à 5 %. L'eau distillée, employée pour les lavages des solutions chloroformiques, doit être exempte de métaux lourds, et en particulier de cuivre, qui provoqueraient la formation de sels complexes difficiles à détruire.

2. — PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE

Dans les recherches exposées au cours de ce travail, l'alumine est le seul adsorbant utilisé au cours des chromatographies. Il est nécessaire d'employer une alumine purifiée pour éviter la formation de sels complexes. Dans le cas des pigments biliaires du groupe de la biliverdine, la formation des sels complexes est immédiatement visible par virage au vert de la solution pigmentée bleue. L'alumine commerciale utilisée est purifiée en employant la technique préconisée par C. Sannié (**92**). L'alumine est tamisée, puis mise à macérer pendant 24 ou 48 heures dans de l'acide chlorhydrique concentré et chaud. Elle est ensuite lavée à grande eau jusqu'à disparition de l'acidité, puis séchée, et enfin calcinée au four électrique à 400° pendant 2 heures ½. L'alumine ainsi traitée étant très active, il est nécessaire dans certains cas de diminuer son pouvoir adsorbant par lavages à l'alcool méthy-

Source : MNHN, Paris

lique (pigments des coquilles de *Turbo*). Dans nos dernières recherches, nous avons utilisé des alumines purifiées plus ou moins désactivées, soit par incorporation d'eau à l'alumine selon le procédé de P. B. Muller (**93, 94**), soit par humidification de l'alumine et standardisation à l'aide de colorants azoïques selon les techniques préconisées par H. Brockmann (**95**).

Les solvants employés pour la chromatographie sont, en général, purifiés, puis desséchés. Cependant, pour l'élution des pigments biliaires, le chloroforme technique donne de meilleurs résultats que le choroforme purifié et desséché, ce dernier ne détermine la formation de zones colorées qu'après addition d'un peu d'alcool méthylique.

Pour fixer les pigments sur la colonne d'alumine, nous employons des mélanges de solvants ; le pigment est dissous dans un solvant approprié, puis la solution est additionnée d'un volume variable d'un autre solvant dans lequel le pigment est insoluble. Pour développer le chromatogramme, nous diminuons la proportion du solvant dans lequel le pigment est insoluble. C'est ainsi que pour chromatographier les porphyrines des coquilles de *Pleria macroptera*, les pigments sont dissous dans du chloroforme, puis la solution est additionnée d'un égal volume d'éther dans lequel la porphyrine est insoluble. Dans ces conditions, les porphyrines se fixent en haut de la colonne d'alumine, tandis qu'un pigment jaune et des substances incolores s'éliminent. Le chromatogramme est ensuite développé à l'aide d'un mélange de deux volumes de chloroforme pour un volume d'éther.

Pour chromatographier les porphyrines de l'ambre gris, nous utilisons un mélange de chloroforme et d'éther de pétrole selon une technique comparable à celle indiquée par J. G. Watson et ses collaborateurs (**71, 72**). Pour les pigments biliaires, nous employons un mélange de chloroforme et d'éther pour fixer les bilirubinoïdes, puis nous développons le chromatogramme à l'aide de chloroforme.

Lorsque les porphyrines sont en petites quantités et mélangées à d'autres pigments brun rouge, il est utile de suivre le développement du chromatogramme aux rayons ultra-violets, afin de situer les zones porphyriniques. Les pigments possédant des radicaux non saturés sont plus fortement adsorbés que ceux à structure fondamentale identique, mais à radicaux saturés. C'est ainsi que la protoporphyrine, qui possède deux groupes vinyle à la place des radicaux éthyle de la mésoporphyrine, est plus fortement adsorbée que cette dernière et peut ainsi en être séparée.

Dans certains cas, nous sortons la colonne d'alumine du tube à chromatographier lorsque les zones sont nettement détachées, puis nous séparons les zones pigmentées et nous éluons les pigments avec un solvant approprié. Cependant nous préférons en général employer la méthode du chromatogramme liquide, c'est-à-dire recueillir séparément les liquides colorés, qui filtrent lorsque les zones correspondantes atteignent respectivement le bas de la colonne d'alumine.

Les pigments séparés par une première chromatographie sont purifiés

Source : MNHN, Paris

par une nouvelle chromatographie sur alumine, puis recristallisés. La cristallisation des pigments est effectuée dans des mélanges de solvants, le pigment est dissous dans un solvant approprié, puis la solution est additionnée d'un égal volume de solvant dans lequel le biochrome est insoluble. C'est ainsi que l'ester méthylique de l'uroporphyrine I, isolé des coquilles de *Pleria macroptera*, est dissous dans du chloroforme, la solution chloroformique étant ensuite additionnée d'acétate d'éthyle ; par évaporation spontanée, le pigment cristallise au sein du mélange en longues aiguilles rouges. Pour les porphyrines de l'ambre gris, les pigments sont dissous dans quelques cm³ de chloroforme, puis la solution est additionnée d'un égal volume d'alcool méthylique à chaud ; par refroidissement les porphyrines cristallisent. Le pigment bleu des coquilles de *Turbo* cristallise au sein d'un mélange de chloroforme et d'acétate d'éthyle.

3. — CARACTÉRISATION DES PIGMENTS

L'étude des spectres d'absorption des porphyrines et des pigments biliaires, dans l'ultra-violet et dans le visible, est d'une grande utilité pour la caractérisation de ces pigments ; en effet, si une telle étude ne peut suffire à la détermination exacte du biochrome étudié, elle permet en général de le ranger dans un groupe de pigments connus et d'avoir une idée de la structure chimique fondamentale. C'est ainsi, par exemple, que tous les pigments biliaires ayant une structure bila-triène possèdent des spectres d'absorption comparables dans l'ultra-violet et le visible ; seules les positions des maxima des bandes d'absorption diffèrent d'un pigment à l'autre, suivant la nature des radicaux fixés sur les noyaux pyrroliques.

Au début de ce travail, l'étude des spectres d'absorption dans l'ultra-violet est réalisée à l'aide du grand spectrographe pour chimistes de Zeiss à optique de quartz, avec un dispositif photométrique à secteur tournant. Les maxima des bandes d'absorption sont précisés à l'aide du microphotomètre de Sannié (**96**). Les spectres dans le visible sont examinés avec le spectrophotomètre d'Yvon et Johin. Dans les deux cas, les courbes d'absorption sont établies en log. ε. Au cours des dernières recherches, les spectres sont étudiés à l'aide du spectrophotomètre de Beckman et les courbes d'absorption données en ε. Dans les divers cas les solvants employés sont l'alcool absolu, le chloroforme et le dioxane.

L'emploi de la chromatographie permet de séparer des traces de pigments pyrroliques dissimulés par d'autres biochromes plus abondants. Dans ce cas, la quantité de pigment isolé par chromatographie étant trop faible pour pouvoir être étudiée chimiquement, il est possible d'identifier le biochrome à l'aide des spectres d'absorption, ainsi que par l'emploi de la chromatographie mixte. C'est ainsi que nous avons pu mettre en évidence des traces d'uroporphyrine I dans des coquilles de *Pleria margaritifera*, de divers *Trochus* et de *Clanculus pharaonis*.

Source : MNHN, Paris

Lorsque la quantité de pigment isolé est suffisante, nous prenons le point de fusion mixte, nous effectuons une chromatographie mixte et nous examinons les spectres d'absorption. Enfin, si le pigment obtenu est suffisamment abondant, nous en effectuons l'analyse élémentaire.

Nous avons également employé la chromatographie sur papier pour préciser le nombre de groupements acides contenus dans les pigments biliaires des coquilles d'*Haliotis cracherodii*.

Nous devons signaler que le terme de biochrome, souvent employé au cours de notre exposé, est préconisé par D. L. Fox (**97**) pour désigner les pigments naturels.

Source MNHN, Paris

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DES PIGMENTS PYRROLIQUES DES COQUILLES DE MOLLUSQUES

L'exposé sur les biochromes des coquilles de Mollusques se divise en deux parties : l'une concernant les *porphyrines*, l'autre les *pigments biliaires*.

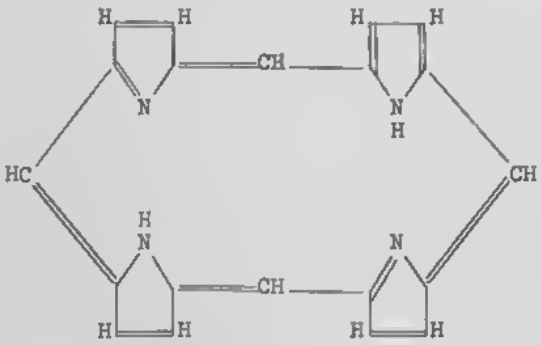
CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE DES PORPHYRINES

Bien que les recherches sur les porphyrines fassent l'objet d'un travail antérieur (28), nous en donnons un rapide aperçu, car il nous semble intéressant de rassembler dans un même ouvrage l'ensemble des connaissances actuelles sur les pigments pyrroliques des coquilles de Mollusques.

A. — NOMENCLATURE

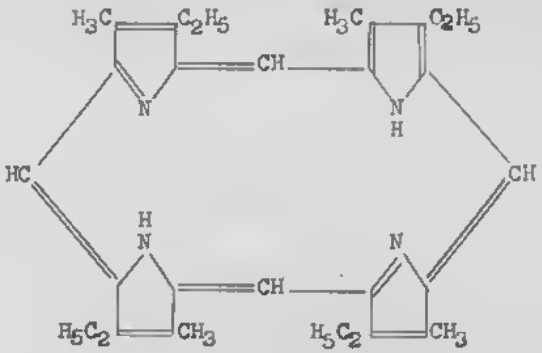
Les porphyrines sont des pigments, naturels ou synthétiques, possédant quatre noyaux pyrrole reliés entre eux en position α par quatre ponts méthènes =CH—. Elles dérivent toutes d'un même squelette : la porphine, et se différencient les unes des autres par les radicaux fixés sur les carbones en position β à la place des atomes d'hydrogène.



Porphine.

Source MNHN, Paris

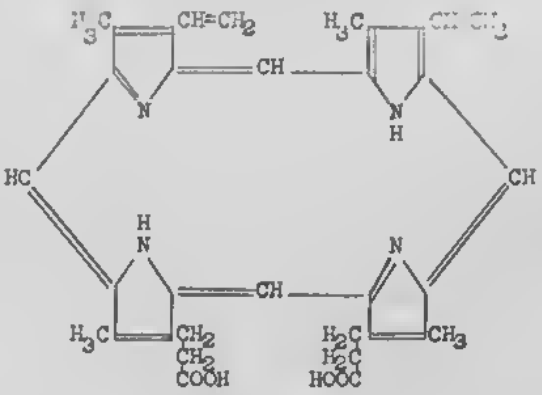
L'une des porphyrines les plus simples est l'étioporphyrine qui ne contient dans sa molécule que des radicaux méthyle et éthyle. Suivant la position de ces radicaux, il est possible d'envisager l'existence de quatre isomères,



Etioporphyrine I.

désignés par les chiffres romains I, II, III et IV. Il en est de même pour les coproporphyrines et les uroporphyrines.

Pour la protoporphyrine, qui possède des groupements méthyle, vinyle et propanoïque, il existe quinze isomères numérotés de I à XV. La protoporphyrine naturelle est affectée du chiffre IX.



Protoporphyrine IX.

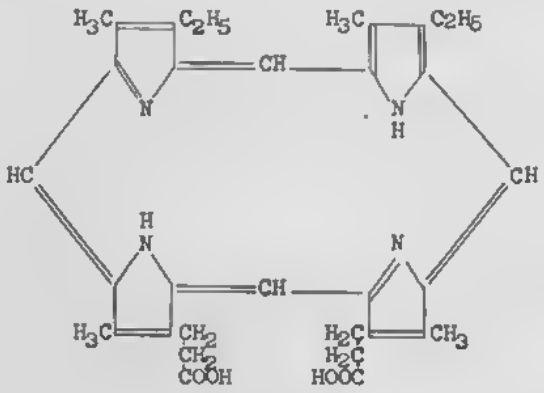
La réduction des radicaux vinyliques de la protoporphyrine IX en groupes éthyle conduit à la mésoporphyrine IX.

B. — HISTORIQUE

En 1930, H. Fischer et K. Jordan (98) isolent des coquilles d'une Huître perlière (*Pteria radiata* Lam.) un pigment rouge fluorescent : la conchoporphyrine. Ils signalent en outre la fluorescence rouge des coquilles d'*Avicula*

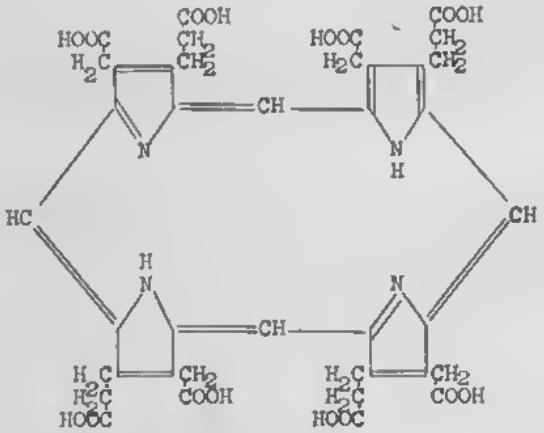
Source MNHN, Paris

lentigenosa et d'*A. castanea*. En 1932, H. Fischer et E. Haarer (**99**) extraient le pigment fluorescent d'une autre espèce d'Huître, *Pteria vulgaris* Schum., et l'identifient avec l'uroporphyrine I. Ce n'est qu'après de nom-



Mésoporphyrine IX.

breuses recherches synthétiques (**100**, **101**, **102**, **103**, **104**) et analytiques (**66**) que H. Fischer et ses collaborateurs peuvent attribuer à l'uroporphyrine I la formule suivante :



Uroporphyrine I.

Finalement, H. Fischer conclut à l'identité de la conchoporphyrine avec l'uroporphyrine I. En effet, les produits de dégradation de ces deux pigments sont identiques et l'analyse chromatographique sur talc ne permet aucune séparation des deux porphyrines mélangées. Récemment, A. Comfort (**105**) examine la fluorescence en lumière ultra-violette d'un grand nombre de coquilles, puis fait un exposé général sur les pigments des Mollusques (**106**) et préconise l'emploi de leurs tests comme source pratique d'uroporphyrine I (**107**). R. E. H. Nicholas et A. Comfort (**80**), appliquant l'analyse chroma-

Source · MNHN, Paris

tographique sur papier à l'étude des porphyrines de divers genres, montrent la présence de traces d'une coproporphyrine, à côté de l'uroporphyrine, dans les coquilles de *Pleria radiata* et de *P. vulgaris*. En outre, ils signalent l'existence d'une uroporphyrine dans les tests de *Trivia europea*, *Bulla sp.*, *Placuna cella*, *Umbonium australe*, *Malleus vulgaris* et *Gibbula cineraria*.

C. — RECHERCHES PERSONNELLES

I. — PORPHYRINES DES COQUILLES DE PTÉRIDÉS

Les Ptéridés sont des Mollusques Bivalves Anisomyaires appartenant au groupe des Ptériacés. Nous avons étudié deux exemplaires de *Pleria* (= *Avicula*) *macroptera* Link et une valve de *P. margaritifera* L. Les coquilles de *P. macroptera* provenaient de Zanzibar ; leur surface externe brunâtre et plus particulièrement les bords noirâtres de la face interne montraient une nette fluorescence rouge en lumière ultra-violette. Par contre, la coquille de *P. margaritifera* ne présentait aucune fluorescence. La teneur en porphyrine des coquilles de *P. macroptera* étant relativement élevée, nous avons pu en faire une étude détaillée.

a) *PRÉPARATION*

1° Extraction et estérification des pigments.

Nous n'insisterons pas sur la technique d'extraction des pigments fluorescents, l'ayant déjà mentionnée en détails antérieurement (**28**). Les coquilles sont attaquées par de l'alcool méthylique chlorydrique à 10 pour 100, qui dissout et estérifie la porphyrine. La solution alcoolique rouge brun, fluorescente, est reprise par du chloroforme et de l'eau distillée. Finalement la couche chloroformique décantée est lavée avec une solution de carbonate de sodium à 5 pour 100, puis concentrée sous vide.

2° Isolement et purification de la porphyrine par chromatographie.

Les travaux de J. C. Watson et de ses collaborateurs (**71**, **72**) sur la chromatographie des uroporphyrines n'étaient pas connus en France lorsque nous avons entrepris ces recherches. La technique proposée donne d'excellents résultats pour la séparation et la purification de l'uroporphyrine I.

Chromatographie de la porphyrine de *Pleria macroptera*.

La solution chloroformique, additionnée d'un égal volume d'éther anhydre, est filtrée sur une colonne d'alumine. Les pigments se concentrent à la partie supérieure de la colonne en une couche grisâtre à l'intérieur de laquelle apparaît une zone rougeâtre. En outre un pigment jaune peu abon-

Source MNHN, Paris

dant s'élimine à travers la colonne. La zone rougeâtre fluorescente est ensuite détachée de la couche grisâtre supérieure à l'aide d'un mélange de deux volumes de chloroforme pour un volume d'éther anhydre (fig. 1, *a*). Cette zone nettement délimitée chemine jusqu'en bas de la colonne ; nous recueillons le solvant qui filtre en entraînant le pigment rouge. A la suite de cette zone rouge se détache un anneau rouge violacé à fluorescence orange ; la couche grisâtre, demeurant à la partie supérieure de la colonne d'alumine, ne présente plus aucune fluorescence.

La solution chloroformique rouge à fluorescence rouge intense présente le spectre à cinq bandes, caractéristique des porphyrines neutres. Le pigment de l'anneau rouge violacé n'étant obtenu qu'en très faible quantité, nous ne poursuivons pas son étude.

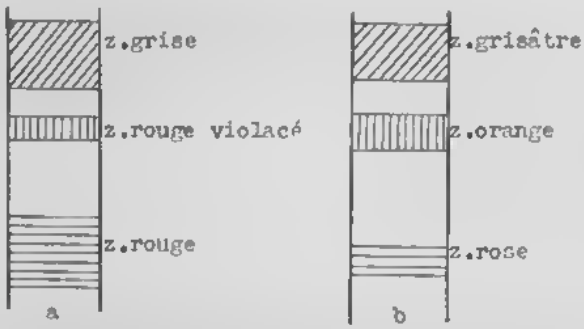


Fig. 1.

Par évaporation spontanée de la solution chloroformique rouge, la porphyrine cristallise en longs et fins cristaux rouges, courbes, enchevêtrés. Ces cristaux sont lavés avec un peu d'acétate d'éthyle qui enlève des traces de pigment orangé. Finalement, après une nouvelle chromatographie, la porphyrine est recristallisée au sein d'un mélange chloroforme-acétate d'éthyle. Des deux coquilles de *Pteria macroptera* nous avons extrait 22 mg. d'ester méthylique de la porphyrine.

Chromatographie de la porphyrine de *Pteria margaritifera*.

L'analyse chromatographique est conduite selon la technique précédente. Le développement à l'aide du mélange de deux volumes de chloroforme pour un volume d'éther permet de séparer un anneau rose à fluorescence rouge, ainsi qu'une zone orange à fluorescence orange (fig. 1, *b*). La solution chloroformique rose, recueillie lorsque la zone à fluorescence rouge atteint le bas de la colonne d'alumine, présente le spectre d'absorption des porphyrines. La teneur en porphyrine des coquilles de *Pteria margaritifera* étant trop faible pour pouvoir tenter l'isolement de ce biochrome, nous avons dû nous contenter d'en faire un examen spectroscopique.

Source MNHN, Paris

b) *PROPRIÉTÉS*

1° Porphyrine de Pteria macroptera.

Isolé sous forme de longues et fines aiguilles rouges, l'ester méthylique de la porphyrine de *Pteria macroptera* fond au bloc de Maquenne à 295° ; ce point de fusion est analogue à ceux des esters méthyliques de l'uroporphyrine I (293°) (**108**). Signalons cependant que H. Fischer et H. F. Hofmann (**66**) situent le point de fusion de l'ester méthylique de l'uroporphyrine I, purifié par chromatographies sur talc, à 301°, tandis que M. Grinstein et ses collaborateurs (**72**), après chromatographie sur carbonate de calcium, indiquent pour ce pigment un point de fusion de 284° et prétendent que les variations des points de fusion plus élevés sont dues à une saponification partielle ou à la présence de complexes métalliques.

Comme l'ester méthylique de l'uroporphyrine I, le pigment de *Pteria macroptera* est très soluble dans le chloroforme, insoluble dans l'éther, l'acétate d'éthyle et l'acide acétique pur ou dilué.

La teneur en C, H, N s'accorde avec la formule élémentaire $C_{48}\ H_{54}\ O_{16}\ N_4$, qui est celle des esters méthyliques des uroporphyrines.

	Prise d'essai en mg.	CO_2 en mg.	H_2O en mg.
	3,381	7,555	1,777
	C %	H %	
Trouvé.	60,97	5,88	
Calculé.	61,13	5,77	

Le dosage de l'N, effectué selon la microméthode de Dumas, indique une teneur de 5,83 pour 100, le taux d'N des esters méthyliques des uroporphyrines est de 5,95 pour 100.

Spectre dans l'ultra-violet.

Les solutions porphyriniques présentent à la limite du visible et de l'ultraviolet une bande d'absorption dont le maximum se situe aux environs de λ 400 $m\mu$; nous avons observé, pour le pigment de *Pteria macroptera* en solution chloroformique, un maximum d'absorption à λ 408$_{\mu}$ m.

Spectre dans le visible.

Les maxima trouvés avec la solution chloroformique de l'ester méthylique de la porphyrine de *Pteria macroptera* se situent à : I λ 625 $m\mu$; Ia λ 600 $m\mu$; II λ 570 $m\mu$; III λ 532 $m\mu$; IV λ 500 $m\mu$. Ils sont entièrement comparables à ceux des esters méthyliques des uroporphyrines : I λ 624 $m\mu$; Ia λ 597 $m\mu$; II λ 569 $m\mu$; III λ 531 $m\mu$; IV λ 499 $m\mu$.

Sel complexe de cuivre.

Cristallisé en fines aiguilles rouge vif, courbes, souvent réunies en amas

Source MNHN, Paris

(aspect de gerbes), le sel complexe de cuivre de la porphyrine de *Pteria macroptera* fond à 345-346°. Le point de fusion du sel complexe de l'uroporphyrine I est de 346-348° (**109**). L'un et l'autre sont solubles dans le chloroforme, insolubles dans l'acétate d'éthyle et l'acide acétique. Leurs spectres dans le visible sont identiques ; leurs courbes d'absorption présentent en effet deux maxima situés, l'un à λ 565 $m\mu$, l'autre à λ 528 $m\mu$.

2° Porphyrine de Pteria margaritifera.

La solution chloroformique rose à fluorescence rouge de la porphyrine de *Pteria margaritifera* présente quatre bandes d'absorption, dont les maxima correspondent exactement à ceux que nous avons observés avec l'ester méthylique de l'uroporphyrine de *P. macroptera* : I λ 625 $m\mu$; II λ 570 $m\mu$; III λ 532 $m\mu$; IV λ 500 $m\mu$.

c) *CONCLUSION*

Malgré de nombreuses cristallisations, H. Fischer n'a pu obtenir la porphyrine (conchoporphyrine) de *Pteria radiata* à l'état pur, et ce n'est qu'après de nombreuses années de recherches qu'il a finalement identifié cette porphyrine avec l'uroporphyrine I, grâce à l'étude de ses produits de dégradation et à l'emploi de la chromatographie sur talc. Par contre la porphyrine des coquilles de *P. vulgaris* n'étant pas souillée par d'autres substances colorées, H. Fischer l'a identifiée facilement avec l'uroporphyrine I. La technique de chromatographie sur alumine, que nous venons d'indiquer, rend aisé l'isolement et la purification des porphyrines des coquilles de Mollusques, lorsqu'elles sont accompagnées de nombreuses impuretés.

Par son aspect cristallin, son analyse élémentaire, ses spectres et ses solubilités, la porphyrine de *P. macroptera* s'apparente aux uroporphyrines. Par son point de fusion et par celui de son sel complexe de cuivre, elle s'identifie avec l'uroporphyrine I. Au cours de la chromatographie, nous n'avons pas décelé la présence de l'uroporphyrine III qui accompagne généralement l'uroporphyrine I dans les cas de porphyrie.

L'analyse chromatographique permet de mettre en évidence des traces d'uroporphyrine I dans les coquilles de *P. margaritifera*. Il semble ainsi que la présence d'uroporphyrine I dans les tests des Ptéridés soit un fait général. Dans certaines espèces (*P. macroptera*, *P. vulgaris*, *P. radiata*), la proportion d'uroporphyrine I est relativement importante, alors que dans d'autres espèces (*P. margaritifera*) elle n'existe qu'à l'état de traces. L'existence d'une coproporphyrine, signalée par R. E. H. Nicholas et A. Comfort, dans les coquilles de *P. radiata* et *P. vulgaris* est, par contre, inconstante et de faible importance.

Source MNHN, Paris

II. — PORPHYRINES DES COQUILLES DE TROCHIDÉS

Rappelons que les Trochidés sont des Mollusques Gastéropodes Prosobranches du groupe des Trochacés. Nous avons examiné les pigments des coquilles de *Clanculus pharaonis*, de *Trochus virgatus* et de *T. maculatus*.

a) *PRÉPARATION*

La coquille de *Clanculus pharaonis* L., rouge corail avec des granulations noires et blanches, montre en lumière ultra-violette une fluorescence rouge sombre ; les coquilles de *Trochus virgatus* Gmelin et de *T. maculatus* L. présentent des taches roses ou brunâtres.

Les pigments de ces divers Trochidés sont extraits selon la technique indiquée antérieurement. Le comportement chromatographique de leur porphyrine est identique à celui de l'uroporphyrine I de *Pleria macroplera*. Dans le cas des coquilles de *Clanculus*, la porphyrine cristallise en longues aiguilles fines, réunies en amas feutrés (aspect de touffes de cheveux des uroporphyrines).

b) *PROPRIÉTÉS*

La porphyrine des coquilles de *Clanculus pharaonis* est soluble dans le chloroforme, insoluble dans l'éther. Le spectre de sa solution chloroformique est superposable à celui de l'ester méthylique de l'uroporphyrine de *Pleria macroplera* : I λ 625 m_μ ; II λ 572 m_μ ; III λ 532 m_μ ; IV λ 500 m_μ. Enfin une chromatographie sur alumine d'un mélange des deux porphyrines ne donne lieu à aucune séparation des pigments.

Les solutions chloroformiques roses obtenues avec les coquilles de *Trochus* ont également des spectres d'absorption superposables à celle de l'uroporphyrine de *Pleria macroplera* : I λ 625 m_μ ; II λ 572 m_μ ; III λ 533 m_μ ; IV λ 500 m_μ.

La quantité de porphyrine que renferment les coquilles des Trochidés est trop faible pour pouvoir tenter l'isolement et l'étude plus complète de ce pigment.

c) *CONCLUSION*

Nous avons obtenu à l'état cristallisé la porphyrine des coquilles de *Clanculus pharaonis* et montré la présence d'une porphyrine dans les coquilles de *Trochus virgatus* et de *T. maculatus*. Ces diverses porphyrines de Trochidés ont un comportement chromatographique analogue à celui de l'uroporphyrine de *Pleria macroplera* ; leurs spectres d'absorption sont également identiques. Certaines coquilles de *Trochus* possèdent un pigment vert, présentant les caractères d'une biliverdine ; il aurait été intéressant de pouvoir isoler ce bilirubinoïde et de comparer ses propriétés à celles de

Source MNHN, Paris

biochromes des tests de *Turbo* et d'*Haliotis*. Nous n'avons pu malheureusement nous procurer le matériel nécessaire pour cette étude.

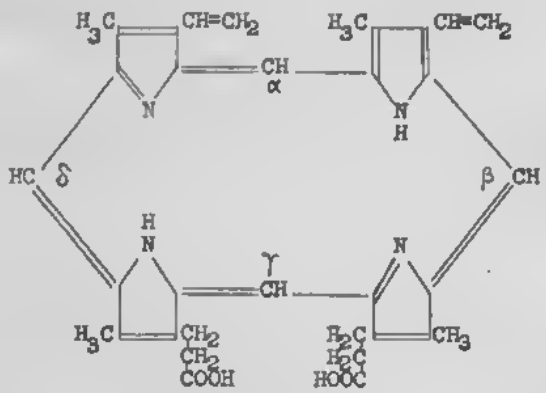
Enfin, l'observation de ces divers Mollusques à l'état vivant permettrait de rechercher l'origine de l'uroporphyrine I et de voir s'il s'agit d'un produit de dégradation ou plutôt de biosynthèse.

CHAPITRE II

ÉTUDE DES PIGMENTS BILIAIRES

A. — NOMENCLATURE

Afin de rendre plus compréhensible l'exposé du présent travail, il nous paraît utile de dire quelques mots sur la nomenclature et les propriétés générales des pigments biliaires. C'est surtout grâce aux nombreuses recherches analytiques et synthétiques de H. Fischer et de W. Siedel que la constitution chimique de ces pigments naturels, provenant principalement de la destruction de l'hémoglobine, est actuellement bien connue.

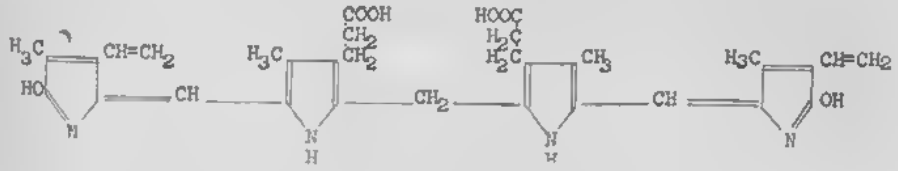


Protoporphyrine IX.

La nomenclature employée pour désigner les pigments biliaires doit tenir compte des porphyrines correspondantes. C'est ainsi qu'il existe quinze isomères possibles de la protoporphyrine, numérotés de I à XV, distincts les uns des autres par les positions respectives des radicaux méthyliques, vinyliques et propanoïques des noyaux pyrroliques. Les pigments biliaires naturels, dérivant de la protoporphyrine IX, seront affectés du chiffre IX. En outre, il est nécessaire de signaler l'endroit où se produit la rupture du

Source : MNHN, Paris

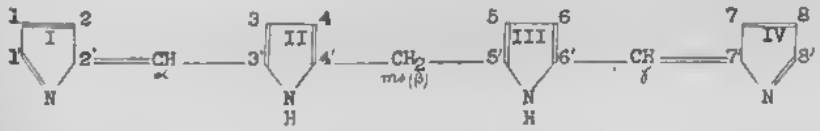
cycle porphyrinique, cette ouverture pouvant avoir lieu aux ponts α, β, γ ou δ. Les pigments biliaires dérivant de la protoporphyrine IX par rupture du cycle porphyrinique au pont α seront affectés du signe $IX\alpha$.



Bilirubine IXα.

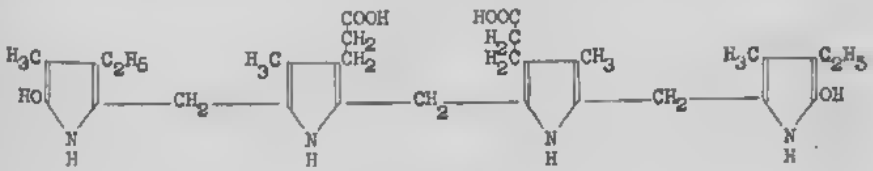
Signalons que le terme de pigments biliaires tend à désigner les pigments pyrroliques naturels provenant de la dégradation du groupement prosthétique de l'hémoglobine et possédant quatre ou seulement deux noyaux pyrroliques, l'expression bilirubinoïdes étant réservée aux dérivés tétrapyrroliques naturels ou synthétiques.

La numération, adoptée par H. Fischer (**110**) et par W. Siedel **111**), est indiquée dans le schéma suivant :



Elle va de 1 à 8 pour les substitutions en position β et de 1' à 8' pour celles en position α. R. Lemberg (**19**) propose, pour éviter toute confusion avec les groupes méthènes (α, β, γ, δ) des porphyrines, d'adopter pour désigner les ponts carbonés des bilirubinoïdes les lettres *a*, *b*, *c*.

Les bilirubinoïdes variés, isolés des diverses sécrétions ou excrétions de l'organisme humain, proviennent d'une réduction plus ou moins complète de la biliverdine $IX\alpha$. Ces pigments doivent leurs propriétés générales et en particulier leur couleur, non aux radicaux fixés sur les noyaux pyrroliques en position β, mais à la présence et à la distribution des doubles liaisons des ponts carbonés. C'est ainsi qu'à la réduction de toutes les doubles liaisons correspond la disparition de la couleur (mésobilirubinogène, stercobilinogène).



Mésobilirubinogène $IX\alpha$.

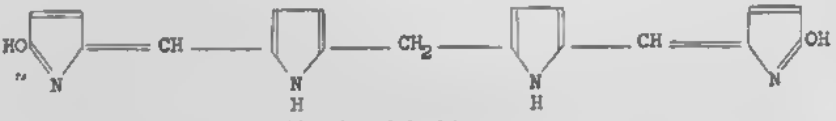
La présence d'une double liaison étant signalée par le suffixe *ène*, la désignation *triène* indiquera la présence de trois doubles liaisons. Pour montrer

Source MNHN, Paris

qu'il s'agit d'un bilirubinoïde, les auteurs allemands emploient le préfixe *bili-*, auquel R. LEMBERG substitue celui de *bila-*. Ainsi la biliverdine, qui

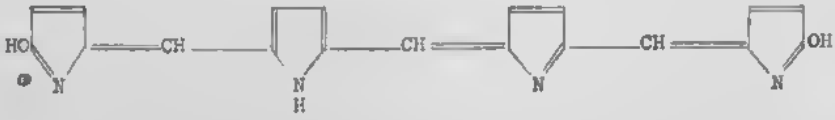
Structure bila-diène (*a*, *b*).

possède trois doubles liaisons, a une structure bili- ou bila-triène. La position des doubles liaisons est précisée à l'aide des lettres désignant les ponts



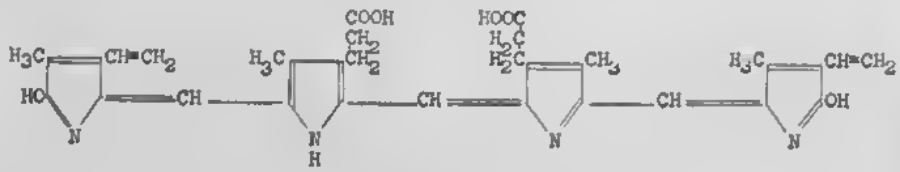
Structure bila-diène (*a*, *c*).

carbonés. Ainsi la bilirubine a une constitution bila-diène (*a*, *c*) et la mésobilivioline une structure bila-diène (*a*, *b*).



Structure bila-triène.

Les pigments, qui possèdent une constitution bila-triène, sont bleus, leurs spectres d'absorption dans l'ultra-violet et dans le visible sont analogues, leurs sels de zinc sont verts, ils donnent avec l'acide nitrique nitreux les phases violette, rouge, orange et jaune de la réaction de Gmelin ; leurs sels de zinc, après oxydation par l'iode, deviennent bleus et présentent une intense fluorescence rouge ainsi qu'un spectre caractéristique. R. LEMBERG désigne ces pigments sous le nom générique de *verdines*. Les bilirubinoïdes qui présentent des propriétés analogues à celles de la bilirubine constituent la classe des *rubines*, tandis que les pigments dont les caractéristiques sont semblables à celles de la mésobilivioline font partie des *violines*.

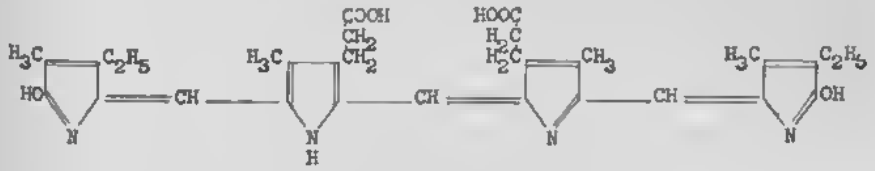


Biliverdine IXα.

Cependant, si à une même structure correspondent des spectres analogues, les positions des maxima des bandes d'absorption dépendent des radicaux

Source MNHN, Paris

fixés sur les noyaux pyrroliques. C'est ainsi que la biliverdine et la mésobiliverdine (ou glaucobiline), qui possèdent, l'une et l'autre, la structure bilatriène, mais qui diffèrent par la présence de deux groupes vinyliques dans la première, remplacés par deux radicaux éthyliques dans la seconde, ont



Glaucobiline IXα.

des maxima d'absorption distincts, aussi bien dans l'ultra-violet que dans le visible (**88**).

Une étude historique et une description détaillée des pigments biliaires, ainsi qu'un aperçu de leur distribution dans les régnes animal et végétal sont donnés par R. Lemberg et J. W. Legge dans leur livre : « Hematin compounds and Bile Pigments » (**19**).

B. — HISTORIQUE

La présence de pigments biliaires dans les coquilles de divers Mollusques appartenant aux genres : *Haliotis*, *Turbo* et *Trochus* est signalée pour la première fois par C. Fr. Krukenberg en 1883 (**112**). Les résultats obtenus par cet auteur sont confirmés quelques années plus tard par F. N. Schulz (**113**). Alors que les pigments d'*Haliotis* donnent lieu à un certain nombre de recherches nouvelles, ceux des coquilles de *Turbo* ne font l'objet d'aucun travail récent.

Attaquant les coquilles de diverses espèces de *Turbo* (*T. olivaceus*, *T. radialus*, *T. petholatus*) par de l'acide acétique ou de l'acide chlorhydrique dilué, C. Fr. Krukenberg obtient des solutions vertes ne présentant pas de spectre d'absorption et donnant la réaction de Gmelin. Ce pigment, qui montre de grandes analogies avec la biliverdine, s'en distingue par le fait qu'il ne peut être extrait des solutions acides ni par le chloroforme, ni par l'éther.

Par ailleurs, à partir des coquilles de *Turbo sarmaticus* et de *T. rugosus*, C. Fr. Krukenberg obtient un pigment, la turbobrunine, qui donne avec l'alcool chlorhydrique une couleur rouge pourpre et qui, dans certaines conditions, se transforme en pigment vert. En 1947 nous avons présenté une note préliminaire (**114**) sur les propriétés du pigment bleu des coquilles de *Turbo Regenfussi*.

Les coquilles d'*Haliotis*, dont la pigmentation a attiré l'attention des chercheurs, sont tantôt rouges (*H. rufescens*), tantôt bleu foncé (*H. gigantea*, *H. californiensis*).

Source MNHN, Paris

Le pigment des coquilles d'*Haliotis rufescens* est étudié par C. Fr. Krukenberg (**112**), puis par F. N. Schulz (**113**). Après destruction du substrat calcaire, le pigment rouge, dissous dans l'alcool ou l'eau acidulée, présente les réactions des pigments biliaires ; il donne en particulier la réaction de Gmelin, celle d'Erlich et, après réduction avec l'amalgame de sodium, celle de l'urobiline. Cependant l'insolubilité de ce pigment dans les solvants organiques et le comportement des spectres le distinguent nettement des biochromes de la série bilirubinique.

Cette étude est reprise en 1930 par Ch. Dhéré et C. Baumeler (**117, 17**). Les réactions et les spectres du pigment (rufescine) en solution aqueuse neutralisée ou alcoolique acide sont soigneusement analysés ; l'action des acides, des bases et des oxydants donne naissance à des produits de coloration variée (haliotirubine, haliotiverdine, halioticyanine) ; les uns possèdent des spectres distincts de ceux des biochromes bilirubiniques, d'autres par contre présentent des analogies évidentes avec les produits d'oxydation de la bilirubine (bilicyanine, cholétéline).

Bien qu'ayant rapproché, dans son premier mémoire (**112**), le pigment bleu d'*Haliotis californiensis* des bilirubinoïdes, F. N. Schulz, dans un travail ultérieur (**118**), le compare à l'indigo. R. Lemberg (**119**), reprenant cette étude, réfute cette seconde hypothèse et réussit, en traitant la poudre de coquilles par un mélange d'alcool absolu et d'acide chlorhydrique concentré, à obtenir un produit présentant les solubilités des esters des pigments biliaires. Cet auteur sépare, grâce à leurs solubilités différentes dans l'acide chlorhydrique dilué, deux pigments qui, en solution chloroformique acide, sont l'un vert (pigment A), l'autre bleu-vert (pigment B). Ces biochromes ne présentent aucune analogie de spectres avec les pigments biliaires connus, leurs sels de zinc ne montrent aucune fluorescence.

Signalons également le travail de T. Kodzuka (**120**) concernant le pigment bleu-vert d'*Haliotis giyantea*. Après réduction du pigment à l'acide iodhydrique et d'iodure de phosphonium, cet auteur observe la réaction des copeaux de pin caractéristique du noyau pyrrolique.

Après avoir fait un bref exposé sur le pigment principal (haliotivioline) des coquilles d'*H. cracherodii* à la séance du 23 juillet 1948 du XIII[e] Congrès International de Zoologie (Paris), nous publions une note préliminaire sur la parenté de ce biochrome avec les bilirubinoïdes (**121**). Entre temps, A. Comfort (**122**) considère de nouveau le pigment bleu d'*H. cracherodii* comme un dérivé de l'indigotine. Les arguments invoqués par A. Comfort sont, d'une part, l'analogie entre les spectres d'absorption dans le visible du produit d'oxydation du pigment principal d'*H. cracherodii* et de l'uroroséine et, d'autre part, la similitude entre les spectres dans l'ultra-violet du pigment bleu d'*Haliotis* et de l'indigotine. Durant un bref séjour à l'Institut de Biologie physico-chimique, A. Comfort prend connaissance de nos recherches, puis, au cours d'une notre rencontre (**123**) sur un biochrome jaune d'*H. cracherodii*, il reconnaît la nature tétrapyrrolique du pigment principal bleu.

Source : MNHN, Paris

C. — RECHERCHES PERSONNELLES

I. — PIGMENTS BILIAIRES DES TURBINIDÉS

Les Turbinidés sont des Mollusques Gastéropodes Prosobranches. Leurs coquilles sont turbinées, lisses ou rugueuses, avec une ouverture arrondie, ovale ou subtétragonale. La surface extérieure est plus ou moins pigmentée, alors que la surface interne de la coquille est nacrée.

A. — Pigments biliaires des coquilles de *Turbo Regenfussi* Desh.

Les exemplaires mis à notre disposition provenaient de Nha Trang (Indochine). Une croûte calcaire recouvrait et protégeait la surface pigmentée.

a) *PRÉPARATION*

1° Extraction et estérification des pigments.

30 coquilles (5 kg. environ) de *Turbo Regenfussi* sont traitées par 8 litres d'alcool méthylique chlorhydrique à 13 pour 100. Très rapidement la liqueur alcoolique se colore en brun, puis en vert. Après 24 heures les coquilles, presque entièrement décolorées, ne présentent plus que quelques zones bleues. La solution alcoolique acide est traitée par fractions de 2 litres, chaque fraction étant additionnée de 500 cm³ de chloroforme, puis d'eau distillée jusqu'à formation d'un trouble blanchâtre. Au cours de la neutralisation à l'aide de bicarbonate de sodium, le chloroforme se sépare en entraînant les pigments. La couche chloroformique bleu-vert est ensuite décantée, puis lavée successivement 3 fois à l'eau distillée, 2 fois avec une solution de carbonate de sodium à 5 pour 100, puis de nouveau à l'eau distillée. Les pigments biliaires, ayant leurs fonctions acides estérifiées, ne sont pas enlevés par la solution alcaline, qui décompose uniquement les chlorhydrates formés en milieu acide. Finalement les solutions chloroformiques provenant des diverses fractions sont réunies, puis déshydratées à l'aide de sulfate de sodium anhydre.

2° Purification et séparation des pigments par chromatographie.

Chromatographie à l'aide d'un mélange éthéro-chloroformique.

Après filtration, la solution chloroformique est évaporée à sec et le résidu est repris par un mélange à volumes égaux de chloroforme et d'éther ; les pigments bleu-vert sont ainsi dissous et débarrassés d'un résidu brunâtre abondant. La solution éthéro-chloroformique est alors filtrée sur une colonne d'alumine désactivée, qui fixe les pigments bleu-vert dans sa portion supérieure, tandis que le filtrat, jaune au début, devient rapidement incolore. Le chromatogramme est alors développé à l'aide de chloroforme technique (fig. 2, *a*). Une première zone bleu pâle se détache et descend rapidement, suivie d'une zone principale bleu foncé nettement séparée de la première

Source MNHN, Paris

par un espace incolore. En haut de la colonne d'alumine demeure une zone brun verdâtre. Les liquides colorés, qui filtrent lorsque les zones bleues atteignent successivement le bas de la colonne d'alumine, sont recueillies séparément.

Par évaporation spontanée de la solution chloroformique bleue correspondant à la zone I, nous n'obtenons aucun produit cristallisé. Ce pigment étant en trop faible quantité pour être étudié, nous nous sommes contenté d'en prendre les spectres d'absorption, qui sont d'ailleurs identiques à ceux du pigment de la zone principale (zone II).

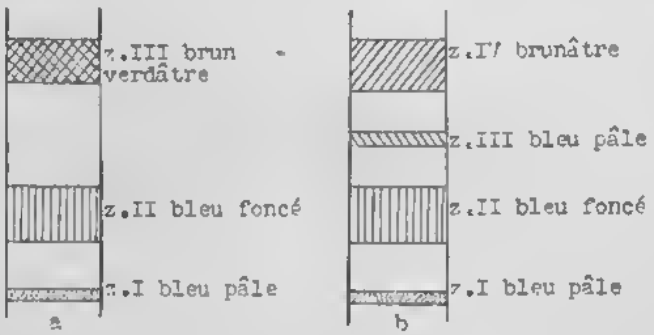


Fig. 2.

Par évaporation de la solution chloroformique bleue correspondant à la zone principale, le pigment cristallise sous forme de prismes bleu foncé réunis en houppes. Ce pigment est rechromatographié sur alumine, puis recristallisé dans un mélange de chloroforme et d'acétate d'éthyle. Nous obtenons ainsi 20 mg. de pigment à l'état d'ester méthylique.

Chromatographie à l'aide d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther.

A la suite d'une autre extraction à partir de 8 coquilles de *Turbo Regenfussi* nous avons employé pour la chromatographie un mélange à volumes égaux d'acétate d'éthyle et d'éther. Les pigments dissous dans ce mélange sont fixés sur la colonne d'alumine. Le chromatogramme est alors développé à l'aide d'acétate d'éthyle pur (fig. 2, *b*).

Comme dans l'expérience précédente, nous distinguons une première zone bleu pâle suivie de la zone principale bleu foncé (zone II). En outre, une troisième zone bleu pâle se détache de la zone supérieure (zone IV) brune. Le pigment de la zone III est en trop faible quantité pour pouvoir être étudié. Nous pensons que ces différentes zones bleu pâle correspondent à des pigments isomères du pigment principal.

Le filtrat correspondant à la zone principale est recueilli, puis rechromatographié selon la technique précédente. Le pigment est finalement recristallisé dans un mélange d'acétate d'éthyle et de chloroforme. Nous obtenons ainsi 3 à 4 mg. de pigment cristallisé.

Source MNHN, Paris

b) *PROPRIÉTÉS*

Le pigment cristallisé, que nous proposons de nommer TURBOGLAUCOBILINE, est très soluble dans le chloroforme, moins soluble dans l'acétate d'éthyle et l'alcool méthylique, très peu soluble dans l'éther, insoluble dans l'éther de pétrole ; ces solubilités correspondent à celles des esters méthyliques des pigments biliaires.

Son point de fusion, pris au bloc de Maquenne, est de 205°-206°. Nous avons observé des points de fusion identiques pour les deux produits chromatographiés différemment.

L'analyse élémentaire (effectuée au Laboratoire du Muséum) nous a fourni les résultats suivants :

1° pour C et H :

Prise d'essai en mg.	H_2O en mg.	CO_2 en mg.	C %	H %
3,841	2,14	8,37	59,46	6,22
2,882	1,63	6,31	59,72	6,31

2° pour N (dosage effectué selon la microméthode de Dumas) :

Prise d'essai en mg.	Volume d'N en cm^3 24° — 761 mm.	N %
4,725	0,325	7,52

3° pour les groupements méthoxyle :

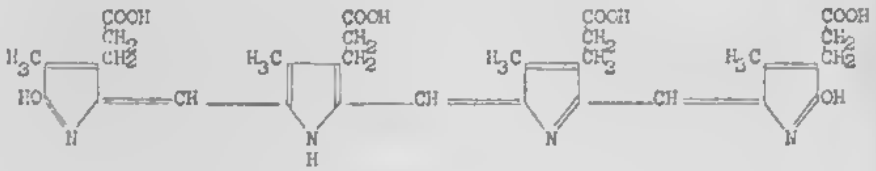
Prise d'essai en mg.	I Ag en mg.	OCH_3 %
2,848	4,096	18,8

Nous donnons à titre comparatif la teneur en éléments des esters méthyliques de quelques pigments biliaires du groupe de la biliverdine, dont la turboglaucobiline présente toutes les propriétés.

Esters méthyliques	C %	H %	N %	OCH_3 %
Turboglaucobiline	59,46	6,22	7,52	18,8
	59,72	6,31		
Coproglaucobiline	64,08	6,35	7,67	16,99
Biliverdine	68,85	6,22	9,17	10,16
Glaucobiline	68,1	6,84	9,12	10,09

Source MNHN, Paris

La turboglaucobiline possède une constitution chimique différente de celle de ces divers pigments ; cependant les formules élémentaires, qui doivent être retenues pour la turboglaucobiline, ainsi que nous le verrons plus loin, sont voisines de celle de l'ester méthylique d'une coproglaucobiline :



Coproglaucobiline I.

$C_{39}H_{46}O_{10}N_4$ dont elles se différencient principalement par la présence de 2 à 3 atomes d'oxygène supplémentaires dans leur molécule.

Les formules élémentaires, s'accordant avec les valeurs analytiques trouvées pour nos préparations de turboglaucobiline, sont les suivantes :

	Calculé		
	C %	H %	N %
$C_{36}H_{44}O_{12}N_4$	59,63	6,12	7,73
$C_{36}H_{46}O_{12}N_4$	59,47	6,38	7,70
$C_{37}H_{44}O_{12}N_4$	60,29	6,02	7,60
$C_{37}H_{44}O_{12}N_4$	60,19	6,27	7,58
$C_{38}H_{44}O_{12}N_4$	60,93	5,92	7,48
$C_{36}H_{44}O_{12}N_4$	60,77	6,18	7,52
$C_{38}H_{46}O_{13}N_4$	59,50	6,05	7,30
$C_{39}H_{46}O_{12}N_4$	61,38	6,08	7,34
$C_{29}H_{44}O_{13}N_4$	60,14	5,95	7,19

Toutes les propriétés de la turboglaucobiline s'accordent avec une structure fondamentale bila-triène (voir p. 64), à laquelle correspond la formule $C_{19}H_6O_2N_4$; en outre, d'après la teneur en méthoxyle et l'analyse chromatographique sur papier, elle renferme 4 groupes carboxyle estérifiés soit $C_8H_{12}O_8$; il ne reste plus sur les noyaux pyrroliques que 4 emplacements disponibles pouvant être occupés par des radicaux - CH_3 soit C_4H_{12}, les carbones supplémentaires ne pouvant être liés au maximum qu'à 2 hydrogènes. Ces divers éléments étant additionnés nous trouvons :

$$C_{19}H_4O_2N_4 + C_8H_{12}O_8 + C_4H_{12} = C_{31}H_{30}O_{10}N_4$$

Ce total étant soustrait des formules pouvant être envisagées pour la turboglaucobiline, on s'aperçoit que seules les formules : $C_{38}H_{44}O_{12}N_4$, $C_{39}H_{46}O_{12}N_4$ et $C_{34}H_{46}O_{13}N_4$, pour lesquelles il reste respectivement $C_7H_{14}O_2$, $C_8H_{14}O_2$ et $C_8H_{16}O_5$, peuvent être retenues ; les autres formules renferment en effet trop d'hydrogène par rapport au nombre d'atomes de carbone. Pour les formules $C_{38}H_{44}O_{12}N_4$ et $C_{39}H_{46}O_{12}N_4$ les teneurs en C sont voisines

Source MNHN, Paris

de celles trouvées pour la turboglaucobiline, par contre les teneurs en H et N sont faibles ; pour la formule $C_{39}H_{46}O_{12}N_4$ la teneur en C est trop élevée, par contre les teneurs en H et N se rapprochent davantage de celles trouvées pour la turboglaucobiline.

Réaction de Gmelin.

La turboglaucobiline, en solution chloroformique, donne avec l'acide nitrique nitreux les phases violette, rouge, orange et jaune de la réaction de Gmelin. Elle correspond en effet, comme la biliverdine, à la phase bleue de la réaction de Gmelin.

Réaction iodo-zincique.

L'addition d'une liqueur alcoolique d'acétate de zinc à la solution chloroformique de la turboglaucobiline provoque la formation d'un sel complexe vert. La solution verte ainsi obtenue ne présente pas de spectre caractéristique, mais seulement une forte absorption dans le rouge. Cependant, oxydée par l'iode, cette solution devient rapidement bleue et présente alors une intense fluorescence rouge et un spectre à deux bandes d'absorption. Cette réaction, caractéristique des pigments biliaires ayant une structure bila-triène, est due à la formation de produits d'oxydation (mésobilipurpurines dans le cas de la glaucobiline) dont les sels complexes de zinc bleus offrent une intense fluorescence rouge et un spectre à deux bandes d'absorption.

Spectre d'absorption dans l'ultra-violet.

L'examen du spectre d'absorption dans l'ultra-violet de la solution

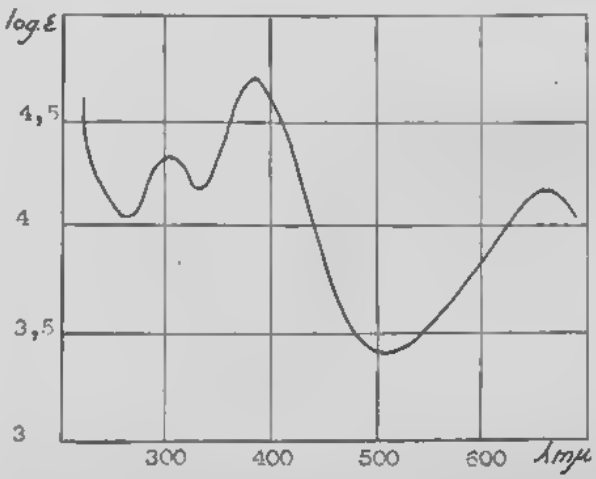


FIG. 3. — Courbes d'absorption de l'ester méthylique de la turboglaucobiline dans l'ultra-violet et le visible.

chloroformique de la turboglaucobiline a été réalisé à l'aide du grand spectrographe pour chimistes de Zeiss.

Source MNHN, Paris

La position des maxima des bandes d'absorption a été précisée par l'enregistrement microphotométrique. Ne connaissant pas la concentration exacte en turboglaucobiline de la solution étudiée, nous avons établi la courbe d'absorption en prenant arbitrairement la concentration $\frac{M}{10.000}$.

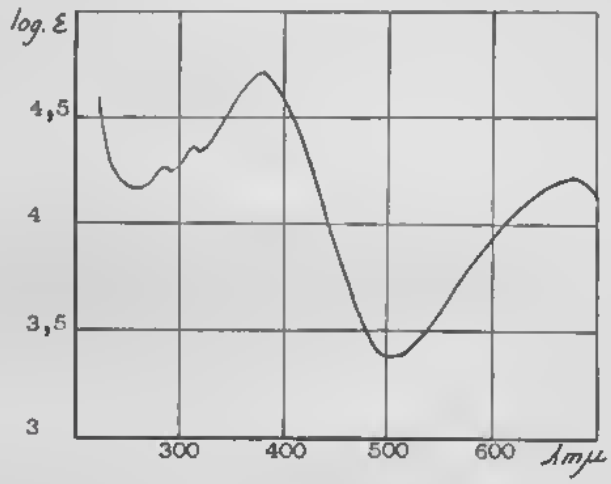


FIG. 4. — Courbes d'absorption de l'ester méthylique de la biliverdine dans l'ultra-violet et le visible.

La courbe d'absorption (fig. 3) présente deux maxima, l'un principal situé à λ 378 m_μ, l'autre secondaire à λ 307 m_μ. Par son allure générale, cette courbe est comparable à celles des esters méthyliques de la biliverdine

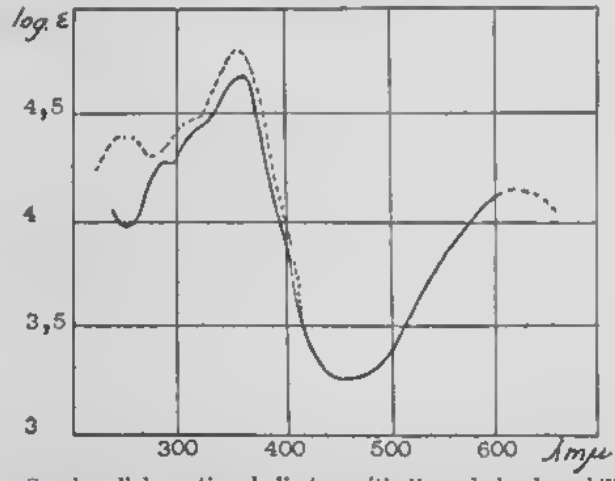


FIG. 5. — Courbes d'absorption de l'ester méthylique de la glaucobiline (—) et de la copro-glaucobiline (- - -) d'après A. STERN et F. PRUCKNER.

(fig. 4), de la glaucobiline et de la coproglaucobiline (fig. 5). Cependant les deux bandes d'absorption secondaires de la biliverdine, de la glaucobiline

Source : MNHN, Paris

et de la coproglaucobiline sont remplacées par une bande unique très nette. En outre, la position du maximum principal (Max. I) de la turboglaucobiline est intermédiaire entre celles des maxima de la biliverdine (λ 384 $m\mu$) d'une part (**88**), de la glaucobiline (λ 363 $m\mu$) et de la coproglaucobiline (λ 363 $m\mu$) d'autre part (**115**).

Les positions des maxima de ces trois biochromes sont données dans le tableau suivant :

Esters méthyliques	Max. I	Max. II	Max. III
	$m\mu$	$m\mu$	$m\mu$
Biliverdine IXα	384	316	282
Turboglaucobiline	378	307	
Glaucobiline IXα.	363	315	286
Coproglaucobiline Iα . . .	363	306	256

L'étude de la courbe d'absorption dans l'ultra-violet de la turboglaucobiline montre nettement que ce bilirubinoïde possède une structure analogue à celle des pigments ayant une constitution fondamentale bila-triène (biliverdine, glaucobiline). Les deux ou trois atomes d'oxygène supplémentaires que possède ce pigment par rapport à la coproglaucobiline ne peuvent être contenus que dans certains radicaux fixés aux noyaux pyrroliques. Le déplacement du maximum principal d'absorption par rapport à ceux de la glaucobiline et de la coproglaucobiline ne peut être imputé qu'à la présence de ces radicaux oxygénés.

Spectres d'absorption dans le visible.

a) *Solution neutre :*

L'absorption dans le visible de la solution chloroformique neutre de la turboglaucobiline a été étudiée à l'aide du spectrophotomètre de G. Yvon et A. Jobin qui nous permet de déterminer la densité optique δ des solutions examinées. Le coefficient d'extinction est calculé d'après la formule : $\varepsilon = \frac{1}{cd}\delta$, c étant la concentration de la solution examinée, d l'épaisseur de la cuve.

Dans l'appareil, l'épaisseur de la cuve étant de 1 cm., la formule devient : $\varepsilon = \frac{1}{c}\delta$ et $\log. \varepsilon = \log. \frac{\delta}{c}$. Ne connaissant pas la concentration exacte en turboglaucobiline de la solution étudiée, nous avons arbitrairement pris la concentration $\frac{M}{10.000}$ pour établir la courbe.

La densité optique de la solution chloroformique bleue de la turboglaucobiline croît à partir d'un minimum situé vers λ 490 $m\mu$, passe par un maximum vers λ 655 $m\mu$, puis décroît lentement (fig. 3). Nous avons employé la même solution pour établir les courbes d'absorption dans le visible et l'ultra-violet, ce qui nous a permis de les réunir dans un même graphique.

Source MNHN, Paris

Le maximum d'absorption de la turboglaucobiline dans le visible est encore intermédiaire entre ceux de la biliverdine (λ 665 $m\mu$) et de la glaucobiline (λ 640 $m\mu$).

b) *Solution acide* :

La densité optique de la solution chloroformique acide bleu-vert, obtenue en ajoutant 2 gouttes d'alcool méthylique chlorhydrique à la solution précédente, croît à partir d'un minimum qui se situe vers λ 490 $m\mu$ et passe par un maximum à λ 665 $m\mu$ (fig. 6). La courbe d'absorption est entièrement comparable à celle de la biliverdine dont le maximum se place à λ 675 $m\mu$.

c) *Sels complexes de zinc* :

L'addition de quelques gouttes d'une solution alcoolique d'acétate de zinc à 1 % à la solution chloroformique neutre de turboglaucobiline provoque le virage du bleu au vert par suite de la formation d'un sel complexe. La densité optique de la solution croît régulièrement du violet au rouge, sans qu'il soit possible de déceler au spectrophotomètre un maximum dans le visible.

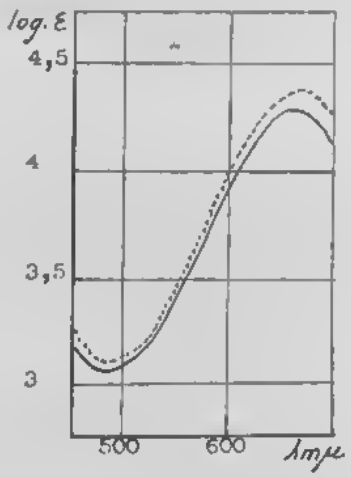


FIG. 6. — Courbes d'absorption des esters méthyliques de la turboglaucobiline (—) et de la biliverdine IXα (- - -) en solutions acides.

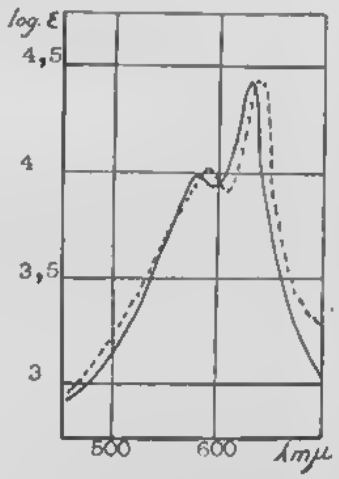


FIG. 7. — Courbes d'absorption des sels de zinc, oxydés par l'iode de la turboglaucobiline (—) et de la biliverdine (- - -).

Par contre, après addition de quelques gouttes d'une solution alcoolique d'iode à 1 %, la liqueur devient rapidement bleue et présente alors une intense fluorescence rouge et un spectre à deux bandes d'absorption caractéristique : l'une principale à λ 635 $m\mu$, l'autre, plus faible, à λ 585 $m\mu$ (fig. 7).

La courbe d'absorption est comparable à celles des sels complexes de zinc, oxydés par l'iode, de la biliverdine (fig. 7) et de la glaucobiline. Cepen-

Source MNHN, Paris

dant les maxima principaux se situent pour la biliverdine à λ 640 $m\mu$ et pour la glaucobiline à λ 627 $m\mu$ (**116**).

Ainsi aussi bien dans le visible que dans l'ultra-violet les solutions de turboglaucobiline présentent des spectres d'absorption entièrement comparables à ceux des bilirubinoïdes du groupe de la biliverdine ; elles ne diffèrent des solutions de ces pigments que par les positions des maxima des bandes d'absorption, les maxima de la turboglaucobiline étant intermédiaires entre ceux de la biliverdine et de la glaucobiline.

c) *CONCLUSION*

Nous proposons de donner au pigment bleu isolé des coquilles de *Turbo Regenfussi* le nom de turboglaucobiline.

Ce pigment, extrait sous forme d'ester méthylique, puis purifié par chromatographie, cristallise sous forme de prismes bleu-foncé (PF 205°-206°). C'est le premier bilirubinoïde de Mollusques obtenu à l'état cristallisé. La turboglaucobiline présente toutes les propriétés des pigment biliaires possédant comme la biliverdine une structure bila-triène (couleurs et spectres des solutions, test de Gmelin et réaction iodozincique) ; elle doit être considérée comme un nouveau bilirubinoïde du groupe des verdines. Les spectres de ses solutions ont été soigneusement étudiés et comparés à ceux de la biliverdine. Les maxima des courbes d'absorption dans l'ultra-violet et le visible ont des positions intermédiaires entre ceux de la glaucobiline et de la coproglaucobiline, d'une part, et ceux de la biliverdine, d'autre part.

L'analyse élémentaire s'accorde avec les formules : $C_{38}H_{44}O_{12}N_4$, $C_{39}H_{46}O_{12}N_4$ et $C_{39}H_{46}O_{16}N_4$. Ces formules, bien que voisines de celle de l'ester méthylique d'une coproglaucobiline $C_{39}H_{48}O_{10}N_4$, s'en distinguent cependant par la présence de 12 ou 13 atomes d'oxygène au lieu de 10 pour une coproglaucobiline. Les deux atomes d'oxygène supplémentaires ne peuvent être contenus que dans les chaînes latérales fixées sur les noyaux pyrroliques en position β. En effet, ainsi que nous l'avons signalé antérieurement, à une structure déterminée correspond un ensemble de caractères donnés ; toute substitution en position α entraînerait une modification de cette structure et un changement des propriétés générales du pigment. Dans le cas de la turboglaucobiline, si les atomes d'oxygène supplémentaires étaient situés en position α, les propriétés de ce pigment ne pourraient plus être comparables à celles des bilirubinoïdes du groupe des verdines.

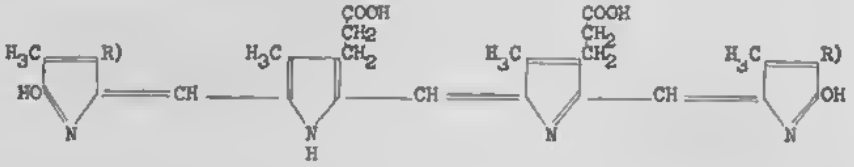
D'après la teneur en groupements méthoxyle, la turboglaucobiline possède quatre fonctions acides comme une coproglaucobiline. Comme nous le verrons ultérieurement, l'analyse élémentaire de la turboglaucobiline donne des résultats comparables à ceux obtenus avec l'haliotivioline, pigment principal des coquilles d'*H. cracherodii*. Tous les pigments biliaires naturels connus jusqu'à ce jour dérivaient de la protoporphyrine ; c'est la première fois que des bilirubinoïdes, ayant une composition voisine d'une coproglau-

Source : MNHN, Paris

cobiline, sont signalés dans le règne animal. Rappelons toutefois que la porphobiline semble posséder des chaînes latérales analogues à celles de l'uroporphyrine ; ce pigment a été obtenu par J. Waldenstrom (11) à partir du porphobilinogène, dipyrrylméthane trouvé dans les urines de malades atteints de porphyrie aiguë.

La présence, dans diverses coquilles de Mollusques, d'uroporphyrine I pouvant par décarboxylation donner de la coproporphyrine I nous incite à penser que la turboglaucobiline possède une structure analogue à celles de ces pigments et que les formules $C_{39}H_{46}O_{12}N_4$ et $C_{39}H_{46}O_{13}N_4$, qui font de ce biochrome une dioxy- ou une trioxycoproglaucobiline, sont les plus vraisemblables.

Chaque noyau pyrrolique des uroporphyrines possède un radical $-CH_2-COOH$ et un groupement $-CH_2-CH_2-COOH$. Dans toutes les autres porphyrines et par conséquent dans tous les pigments biliaires pouvant en dériver, les radicaux éthanoïques de l'uroporphyrine sont remplacés par des groupes méthyle $-CH_3$. Aussi pensons-nous que la turboglaucobiline possède également quatre radicaux méthyle, fixés respectivement sur chacun des quatre noyaux pyrroliques et que les atomes d'oxygène supplémentaires de ce biochrome sont contenus dans les chaînes propanoïques, pour lesquelles il est possible d'envisager les formules $-CHOH-CH_2-COOH$ ou $-CH_2-CHOH-COOH$, de tels radicaux pouvant conduire par décarboxylation et déshydratation à des groupes vinyle : $-CH=CH_2$. Dans ce cas la formule développée de la turboglaucobiline renfermerait soit deux, soit trois radicaux oxypropanoïques et correspondrait au schéma suivant :



R) = $CHOH-CH_2-COOH$ ou $-CH_2-CHOH-COOH$.

Alors que les coproporphyrines renferment quatre chaînes latérales propanoïques, les protoporphyrines n'ont plus que deux restes propanoïques, les deux autres étant remplacés par des groupes vinyle $-CH=CH_2$. D'après les travaux de M. Grinstein et de ses collaborateurs (8), la coproporphyrine III serait directement synthétisée par l'organisme et se trouverait à l'origine de la protoporphyrine IX, deux des groupements propanoïques étant transformés en radicaux vinyle par décarboxylation et déshydrogénation. Ces données confirment la théorie de W. J. Turnen (10) selon laquelle les groupe vinyle se forment aux dépens des chaînes propanoïques. Or on a observé que la décarboxylation biologique n'était possible que dans les systèmes $-CO-COOH$, $-CO-CH_2-COOH$ et $-CH(NH_2)-COOH$. Si la formule proposée pour la turboglaucobiline était confirmée, il faudrait consi-

Source : MNHN, Paris

dérer les chaînes latérales oxypropanoïques de ce pigment, soit comme des formes de passage entre les radicaux propanoïques et vinyliques, soit comme des précurseurs de ces deux groupements.

Nous ne pouvons momentanément proposer cette formule développée que comme une hypothèse de travail, n'ayant eu à notre disposition qu'une trop faible quantité de pigment pour pouvoir en étudier les produits de dégradation.

Ainsi, bien que l'étude de la turboglaucobiline ne permette pas d'émettre une formule définitive pour ce nouveau bilirubinoïde, elle donne toutefois un premier aperçu sur la constitution chimique des pigments biliaires des coquilles de Mollusques.

B. — Pigments biliaires des coquilles de *Turbo marmoratus L.*

a) *PRÉPARATION*

1° Extraction et estérification des pigments.

Une coquille (450 g. environ) de *Turbo marmoratus* est attaquée par de l'alcool méthylique chlorhydrique à 12 %. La liqueur alcoolique se colore rapidement en bleu-vert. Après 24 heures les pigments sont extraits par du chloroforme selon la technique décrite antérieurement. La couche chloroformique décantée, puis lavée avec une solution de carbonate de sodium à 5 pour 100, est finalement desséchée avec du sulfate de sodium anhydre.

2° Purification et séparation des pigments par chromatographie.

Après filtration, la solution chloroformique est évaporée à sec et le résidu repris par un mélange à volumes égaux de chloroforme et d'éther. La solution éthéro-chloroformique est alors filtrée sur une colonne d'alumine, préalablement désactivée par lavages à l'alcool méthylique. Le chromatogramme est ensuite développé à l'aide de chloroforme pur. Une première zone bleu clair descend le long de la colonne d'alumine, suivie d'une zone principale bleu foncé (fig. 8).

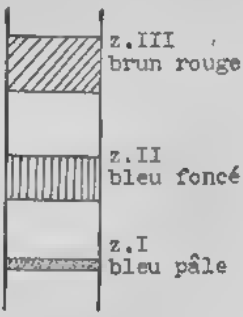


Fig. 8.

En haut de la colonne demeure une zone brun rouge. Lorsque les zones bleues atteignent respectivement le bas de la colonne, nous recueillons séparément les solutions bleues qui filtrent.

Le chromatogramme ainsi obtenu est identique à celui observé dans les mêmes conditions avec la solution pigmentaire de *T. Regenfussi*. Dans les deux cas nous constatons la formation de deux

Source MNHN, Paris

zones bleues : l'une inférieure (zone I), ne correspondant qu'à des traces de pigment, l'autre supérieure (zone II), plus importante.

Par évaporation spontanée de la solution chloroformique correspondant à la zone I, nous n'obtenons qu'un produit impur, mal cristallisé, constitué par quelques aiguilles bleues.

Par évaporation de la solution chloroformique correspondant à la zone II, le pigment cristallise sous forme de prismes bleu foncé, réunis en houppes. Ce pigment est rechromatographié sur alumine et recristallisé dans un mélange de chloroforme et d'acétate d'éthyle.

Nous obtenons ainsi quelques milligrammes de pigment cristallisé.

b) *PROPRIÉTÉS*

Le pigment, isolé des coquilles de *T. marmoratus* à l'état cristallisé, est identique à la turboglaucobiline. Sa forme cristalline et ses solubilités sont comparables, son point de fusion pris au bloc de Maquenne est de 205°-206°. Le mélange des deux pigments ne montre aucun abaissement du point de fusion. L'identité des deux pigments a été en outre établie par une chromatographie mixte. Une solution chloroformique des deux pigments est additionnée d'un égal volume d'éther, puis filtrée sur une colonne d'alumine. Le chromatogramme étant développé avec du chloroforme pur, une seule zone se forme et descend le long de la colonne.

Les spectres d'absorption du pigment, isolé des coquilles de *T. marmoratus*, sont également semblables à ceux de la turboglaucobiline. Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet de la solution chloroformique présente deux maxima dont les positions sont identiques à celles des maxima de la turboglaucobiline ; le maxima principal se situe à λ 378 $m\mu$, le maximum secondaire à λ 307 $m\mu$. La courbe d'absorption dans le visible de la solution chloroformique neutre est également superposable à celle de la turboglaucobiline. La densité optique croît d'un minimum vers λ 490 $m\mu$ pour passer par un maximum à λ 655 $m\mu$. Le spectre d'absorption du sel complexe de zinc, oxydé par l'iode, est aussi comparable à celui de la turboglaucobiline. La solution chloroformique, après addition d'acétate de zinc et d'iode, présente une coloration bleue, une intense fluorescence rouge et deux bandes d'absorption, dont le maximum principal se situe à λ 635 $m\mu$, le maximum secondaire à λ 585 $m\mu$.

c) *CONCLUSION*

Les pigments bleus des coquilles de *Turbo marmoratus* sont comparables à ceux des coquilles de *T. Regenfussi*. Le pigment bleu principal, obtenu à l'état cristallisé, présente des propriétés identiques à celles de la turboglaucobiline.

Source MNHN, Paris

C. — Pigments biliaires des coquilles de *Turbo elegans* Phil.

a) *PRÉPARATION*

1° Extraction et estérification des pigments.

2 coquilles (200 gr. environ) sont immergées dans de l'alcool méthylique à 12 %. Après 24 heures les pigments sont extraits par du chloroforme selon la technique décrite antérieurement. La couche chloroformique, après décantation et lavages avec une solution de carbonate de sodium à 5 %, est finalement déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre.

2° Séparation des pigments par chromatographie.

La solution chloroformique, après filtration, est concentrée à 5 cm³ et additionnée d'un égal volume d'éther. La solution éthéro-chloroformique est versée sur une colonne d'alumine préalablement désactivée par lavages avec l'alcool méthylique. Le chromatogramme, développé avec du chloroforme pur, est identique à celui obtenu avec une solution pigmentaire des coquilles de *T. Regenfussi*.

Une zone principale bleue se détache et descend le long de la colonne d'alumine, précédée d'une zone bleu pâle.

Par évaporation spontanée de la solution chloroformique, correspondant à la zone principale, le pigment cristallise sous forme de prismes bleu foncé, réunis en houppes.

b) *PROPRIÉTÉS*

La quantité de pigment obtenu à l'état cristallisé étant très faible, nous n'avons pu effectuer qu'une chromatographie mixte et examiner les spectres d'absorption dans le visible.

Une solution chloroformique du pigment cristallisé et de la turboglaucobiline est additionnée d'un égal volume d'éther, puis filtrée sur une colonne d'alumine désactivée. Le chromatogramme est développé à l'aide de chloroforme pur. Une seule zone se forme et descend lentement le long de la colonne d'alumine. Aucune séparation des deux pigments n'étant observée, nous pouvons penser qu'ils sont identiques.

La courbe d'absorption de la solution chloroformique neutre du pigment cristallisé est superposable à celle de la turboglaucobiline. Le maximum d'absorption se situe à λ 655 $m\mu$.

Le spectre d'absorption du sel complexe de zinc, oxydé par l'iode, est également comparable à celui de la turboglaucobiline, obtenu dans les mêmes conditions. Le maximum principal se situant à λ 635 $m\mu$, le maximum secondaire à λ 585 $m\mu$.

Source : MNHN, Paris

c) *CONCLUSION*

Le chromatogramme, obtenu avec la solution pigmentaire des coquilles de *Turbo elegans*, est comparable à celui observé dans les mêmes conditions avec les biochromes des coquilles de *T. Regenfussi*. Le pigment principal, cristallisé, a été identifié avec la turboglaucobiline par une chromatographie mixte ; les spectres d'absorption dans le visible de ces deux pigments sont analogues.

II. — PIGMENTS BILIAIRES DES HALIOTIDÉS

Les Haliotidés sont des Mollusques Gastéropodes Prosobranches. Leurs coquilles sont ovales, avec une spire courte, excentrique ; elles sont pourvues d'une rangée de perforations permanentes. Ces coquilles sont recherchées pour leur nacre.

Nous avons examiné les pigments des coquilles bleues d'*Haliotis cracherodii* Leach, originaires des côtes de Californie. Le matériel, étudié antérieurement par les divers auteurs sous le nom d'*H. californiensis* Sow., est selon toute vraisemblance identique à *H. cracherodii* Leach, dont *H. californiensis* n'est qu'une variété peu commune.

a) *PRÉPARATION*

1° Extraction et estérification des pigments.

Les diverses extractions des pigments d'*Haliotis* effectuées au cours de ce travail ont été conduites selon la technique suivante : 5 coquilles d'*Haliotis cracherodii* (300 gr. environ) sont immergées pendant 12 heures dans 4 litres d'alcool méthylique chlorhydrique à environ 12 %. Les pigments sont ainsi dissous et estérifiés. Après concentration sous vide à environ 1.500 cm³, la solution alcoolique bleu-vert est additionnée de 500 cm³ de chloroforme, puis le mélange obtenu est dilué avec de l'eau distillée jusqu'à apparition d'un trouble blanchâtre. Une partie du chloroforme se sépare en une couche verte, tandis que la liqueur surnageante reste colorée en bleu. Au cours de la neutralisation progressive de cette dernière à l'aide de bicarbonate de sodium, des gouttelettes de chloroforme se séparent et se rassemblent en une nouvelle couche violette. Finalement tous les pigments passent en solution chloroformique et la fraction aqueuse ne présente plus qu'une teinte vert pâle.

Après un premier lavage à l'eau distillée, la solution chloroformique est agitée à deux reprises avec une solution de carbonate de sodium à 5 %, puis de nouveau avec de l'eau distillée.

2° Séparation des pigments par chromatographie.

Après distillation du chloroforme sous vide, le résidu pigmentaire est repris par 50 cm³ de chloroforme neutre et sec. La solution violette obtenue

Source MNHN, Paris

est filtrée sur une colonne d'alumine désactivée (90 g.) qui retient les pigments dans sa portion supérieure. La colonne est alors lavée au chloroforme pour éliminer les substances étrangères, qui ne sont pas retenues par l'alumine, puis le chromatogramme est développé à l'aide de chloroforme contenant 0,5 % d'alcool méthylique (fig. 9*a*).

En premier lieu, une zone verte (zone I) se détache de la portion colorée supérieure et descend progressivement le long de la colonne d'alumine, suivie d'un anneau violet rouge (zone II). Lorsque ces deux zones colorées atteignent l'une après l'autre le bas de la colonne, les solutions correspondantes, verte puis violette, sont recueillies au moment de leur filtration. Durant ce premier développement, un anneau brun rouge (zone III) se forme juste au-dessous de la zone violet foncé supérieure (zone IV).

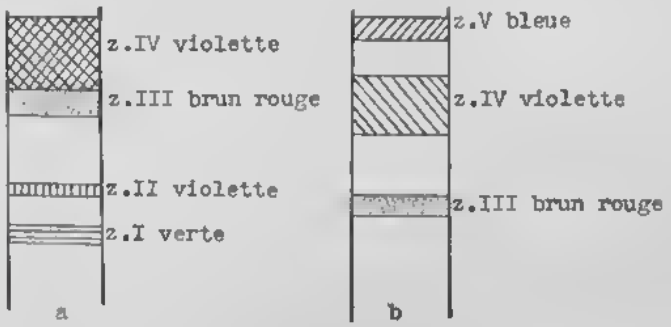


FIG. 9.

L'emploi de chloroforme additionné de 1 % d'alcool méthylique permet un nouveau développement du chromatogramme (fig. 9*b*). La zone brun rouge (zone III) chemine le long de la colonne d'alumine, tandis qu'une zone violette (zone IV) correspond au pigment principal, se détache à son tour de la portion supérieure qui reste colorée en bleu (zone V). Les solutions brun-rouge puis violette sont recueillies lorsque les zones correspondantes atteignent respectivement le bas de la colonne d'alumine.

3° Purification des pigments.

Pigment de la zone I.

Lavée à l'eau distillée, puis concentrée à quelques cm³, la solution chloroformique verte est à nouveau filtrée sur une colonne d'alumine. Du chloroforme, contenant 0,1 puis 0,2 % d'alcool méthylique, est versé sur la colonne. Ce n'est que lorsque la proportion d'alcool méthylique atteint 0,5 % qu'une zone verte homogène descend lentement le long de la colonne, tandis qu'une mince couche violette demeure dans la portion supérieure. La solution verte, recueillie lorsque la zone colorée atteint le bas de la colonne, est chromatographiquement pure. La quantité de pigment étant trop minime

Source MNHN, Paris

pour pouvoir tenter son isolement, nous n'étudierons que les propriétés de ses solutions, en particulier leurs spectres d'absorption.

Pigment de la zone II.

Ce pigment est également purifié par une nouvelle chromatographie de sa solution chloroformique concentrée. Après fixation du pigment, la colonne d'alumine est lavée avec du chloroforme, contenant des proportions croissantes d'alcool méthylique. Lorsque la proportion atteint 1 %, une zone violette nettement délimitée se forme et chemine jusqu'au bas de la colonne d'alumine. Par suite de la faible teneur en pigment violet rouge de la solution ainsi purifiée, nous avons dû nous contenter d'une étude qualitative.

Pigment de la zone III.

Lavée à l'eau distillée puis concentrée, la solution chloroformique brun rouge est de nouveau passée sur une colonne d'alumine. Après adsorption du pigment brun rouge, la colonne est lavée avec du chloroforme contenant 1 puis 2 % d'alcool méthylique, qui entraîne des traces de pigment violet. Le chromatogramme est finalement développé avec du chloroforme renfermant 3 % d'alcool méthylique. Une zone rouge orange se sépare et descend le long de la colonne précédée et suivie d'anneaux jaunes, tandis qu'un pigment violet demeure à la partie supérieure. Le filtrat jaune d'or, correspondant à la zone rouge orange, est recueilli lorsque cette dernière atteint le bas de la colonne.

Afin d'obtenir une solution pure du biochrome principal rouge orange, le filtrat recueilli est soumis à une dernière analyse chromatographique qui permet d'éliminer toute trace de pigments étrangers.

Ce biochrome est finalement précipité par addition d'éther de pétrole à sa solution chloroformique concentrée. Dans ces conditions nous avons obtenu environ 1 mg. de précipité amorphe sec. Les quelques essais de cristallisation effectués sont demeurés sans résultat.

Pigment de la zone IV.

Déshydratée à l'aide de sulfate de sodium sec, puis concentrée à environ 5 cm^3, la solution chloroformique violette est additionnée de deux fois son volume d'éther anhydre. Le pigment principal est alors précipité par passage de gaz chlorhydrique sec au sein du mélange de solvants. Séparé sous forme de flocons bleus amorphes, le chlorhydrate du pigment est recueilli, lavé à l'éther, puis dissous dans du chloroforme.

Après lavages à l'aide d'une solution de carbonate de sodium à 5 %, la solution chloroformique est de nouveau chromatographiée sur alumine désactivée. Le pigment violet se sépare en une zone nette, qui descend le long de la colonne d'alumine lorsque la proportion d'alcool méthylique, ajoutée au chloroforme, est de 3 %. Lorsque cette zone arrive au bas de la

Source MNHN, Paris

colonne, le filtrat violet correspondant est recueilli. En haut de la colonne demeure une nouvelle zone résiduelle bleue.

Réduite à quelques cm³, la solution chloroformique violette est additionnée d'éther de pétrole, puis mise à la glacière. Le précipité formé est recueilli, essoré et séché. Nous avons ainsi obtenu environ 14 mg. de pigment amorphe. Une préparation antérieure, conduite d'une façon un peu différente, nous avait donné une quantité équivalente de pigment.

b) *PROPRIÉTÉS DES PIGMENTS*

1° Pigment de la zone I.

Les solutions chloroformique ou alcoolique du pigment vert présentent des réactions et des spectres d'absorption qui montrent nettement la parenté du biochrome avec les bilirubinoïdes du groupe des verdines (voir pages 63 et 64), c'est-à-dire des pigments biliaires possédant trois doubles liaisons (bila-triènes). Cependant, bien que possédant les propriétés générales des verdines, ce pigment se distingue par diverses particularités, qui indiquent une différence de détail dans sa constitution chimique.

Ses solutions neutres sont plus vertes que celles des esters méthyliques de la biliverdine ou de la turboglaucobiline, qui tendent vers le bleu. Avec l'acide nitrique nitreux, elles virent au bleu, puis au violet, au rouge et à l'orange, donnant ainsi les diverses phases du test de Gmelin, à l'exception de la phase jaune finale de cette réaction. Additionnées d'acétate de zinc et d'iode (réaction iodo-zincique), les solutions passent rapidement du vert jaune au bleu ; en même temps apparaît le spectre d'absorption caractéristique à deux bandes des sels de zinc des bilipurpurines, mais aucune fluorescence rouge ne peut être décelée. Cette absence de fluorescence des complexes zinciques se retrouve dans toute la série des pigments d'*H. cracherodii* ; c'est l'une des propriétés qui distingue ces bilirubinoïdes des biochromes de la série bilirubinique. Des constatations similaires ont été faites par H. Fischer (**124**) pour quelques dérivés synthétiques des esters méthyliques de la bilirubine et de la biliverdine, dont nous parlerons ultérieurement.

Spectres d'absorption.

a) *Solutions neutres* :

L'allure de la courbe d'absorption du pigment vert dans le chloroforme est entièrement comparable à celle des courbes observées avec les esters méthyliques de la biliverdine IXα, de la mésobiliverdine IXα (ou glaucobiline) et de la turboglaucobiline. C'est ainsi que dans l'ultra-violet cette courbe présente un maximum principal à λ 402 mμ et deux maxima secondaires à λ 322 mμ et à λ 275 mμ (fig. 10). Le maximum principal est déplacé vers les grandes longueurs d'ondes par rapport à celui de l'ester méthylique de la biliverdine, qui se situe à λ 384 mμ (fig. 4). Un tableau

Source MNHN, Paris

donnant les positions des maxima de la biliverdine, de la mésobiliverdine (glaucobiline) et de la coproglaucobiline est donné au cours de l'étude des propriétés de la turboglaucobiline (voir page 73).

Dans le visible, la courbe d'absorption du pigment vert est également comparable à celle de la biliverdine, mais le maximum se situe à λ 702 $m\mu$ au lieu de λ 665 $m\mu$ pour la biliverdine (fig. 10). C'est la première fois qu'il nous

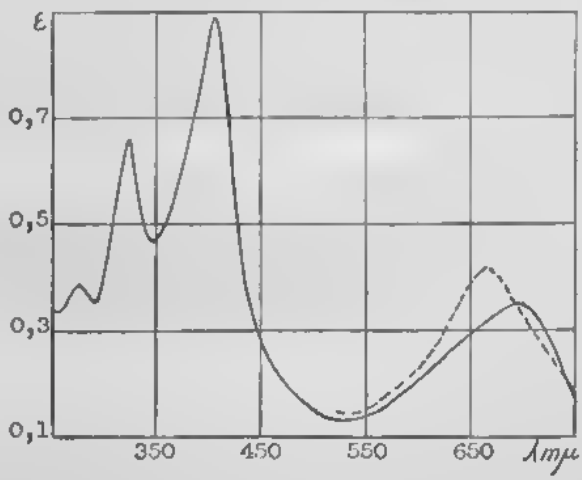


FIG. 10. — Courbes d'absorption du pigment vert dans l'ultra-violet et le visible, en solution neutre (—), et dans le visible en solution acide (- - -).

est donné de constater un décalage aussi sensible des maxima d'absorption vers les grandes longueurs d'ondes chez un pigment du groupe des verdines. Il est à noter également que les maxima des solutions chloroformique ou alcoolique du pigment vert dans le visible sont identiques ; or, comme nous le verrons ultérieurement, la polarité du solvant exerce une influence marquée sur les positions des maxima du pigment brun rouge de la zone III.

b) *Solutions acides :*

Après addition de quelques gouttes d'alcool méthylique chlorhydrique, la solution chloroformique vert vif présente une courbe d'absorption dont le maximum se situe à λ 655 $m\mu$ (fig. 10) ; or, dans le cas des verdines un décalage inverse se produit, le maximum étant à λ 675 $m\mu$ pour la biliverdine acide.

c) *Sels complexes de zinc :*

Lorsque quelques gouttes d'une liqueur alcoolique d'acétate de zinc à 1 0/0 sont versées dans la solution chloroformique neutre, la teinte de celle-ci vire au jaune vert et le maximum d'absorption passe à λ 755 $m\mu$.

Si nous ajoutons ensuite une ou deux gouttes d'une solution alcoolique d'iode à 1 0/0, la teinte passe progressivement au vert puis au bleu ; en

Source : MNHN, Paris

même temps apparaît le spectre caractéristique à deux bandes des sels de zinc des bilipurpurines, le maximum principal étant à λ 665 $m\mu$ et le maximum secondaire à λ 615 $m\mu$ (fig. 11). Dans des conditions identiques, l'ester méthylique de la biliverdine présente un maximum principal à λ 640 $m\mu$ et un maximum secondaire à λ 590 $m\mu$.

Dans le cas de la biliverdine apparaît également une intense fluorescence rouge ; avec le pigment vert d'*Haliotis cracherodii* aucune fluorescence n'est visible.

Ainsi le pigment vert d'*H. cracherodii* présente de nombreuses analogies avec les verdines, mais des différences notables dans les positions des maxima d'absorption et l'absence de fluorescence du complexe zincique oxydé montrent que ce biochrome possède une constitution quelque peu différente des autres bilirubinoïdes à structure bila-triène (voir page 64).

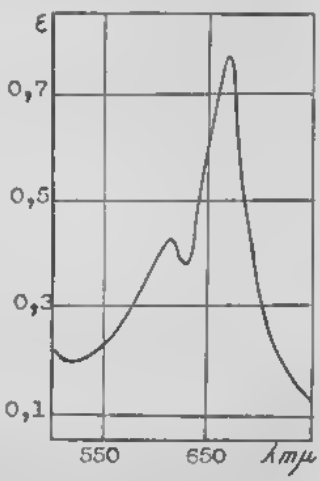


FIG. 11. — Courbe d'absorption du pigment vert après addition d'acétate de zinc et d'iode.

Signalons qu'au cours d'une étude succincte des pigments d'*Haliotis rufescens*, nous avons séparé par chromatographie sur alumine un pigment vert, dû à une oxydation partielle du biochrome rouge des coquilles en milieu alcoolique acide. Les solutions de ce pigment donnent, avec l'acide nitrique nitreux, les phases bleue, violette, rouge et orange du test de Gmelin. Additionnées d'acétate de zinc et d'iode, elles passent au bleu-vert puis au bleu, mais ne montrent aucune fluorescence rouge (réaction iodozincique). La courbe d'absorption en milieu chloroformique présente

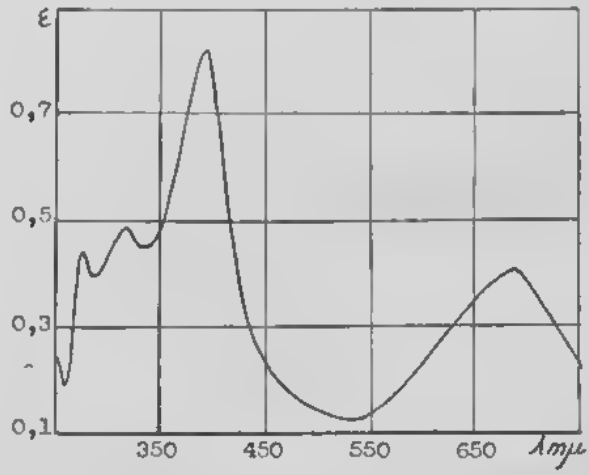


FIG. 12. — Courbe d'absorption d'un pigment vert d'*Haliotis rufescens*.

Source : MNHN, Paris

dans l'ultra-violet un maximum principal à λ 395 mμ et deux maxima secondaires à λ 315 mμ et à λ 272 mμ ; le maximum dans le visible se situe à λ 685 mμ (fig. 12).

Les propriétés de ce pigment sont donc comparables à celles du biochrome vert d'*H. cracherodii* ; cependant ces deux bilirubinoïdes ne sont pas identiques, car leur comportement chromatographique est différent, le pigment vert d'*H. rufescens* ne pouvant être détaché de la partie supérieure de la colonne d'alumine qu'à l'aide de chloroforme contenant 5 % d'alcool méthylique. Cette étude préliminaire, dont nous reparlerons au cours de l'étude du pigment jaune orange de la zone III, devait être signalée, car elle indique une parenté probable entre les pigments d'*H. rufescens* et d'*H. cracherodii*.

Réduction.

Afin de savoir si le pigment vert de la zone I devait être considéré comme un produit d'oxydation du biochrome jaune orange de la zone III, nous l'avons réduit à l'aide d'hydrosulfite de sodium pour passer du stade verdine à celui de rubine (voir page 64).

Agitée avec de l'hydrosulfite de sodium en poudre et quelques cm³ d'eau distillée, la solution chloroformique acide, vert vif, devient rapidement vert, jaune, puis jaune orange. Lavée à l'eau distillée puis avec du carbonate de sodium à 5 %, la solution chloroformique jaune orange est examinée au spectrophotomètre de Beckman, puis versée sur une colonne d'alumine. Les pigments étant absorbés à la partie supérieure de la colonne, cette dernière est lavée avec du chloroforme, contenant des proportions croissantes d'alcool méthylique. Quand la proportion d'alcool est de 1 %, une zone verte, correspondant au pigment non réduit, se détache puis s'élimine à travers la colonne ; lorsque la quantité d'alcool atteint 3 %, le pigment encore fixé à la partie supérieure se rassemble en une zone orange unique qui chemine peu à peu jusqu'au bas de la colonne ; le filtrat jaune d'or correspondant à cette zone est alors recueilli.

Pour essayer d'établir l'identité de ce pigment jaune orange avec celui de la zone III, nous avons tout d'abord examiné les spectres d'absorption des solutions chloroformique et alcoolique, puis procédé à une chromatographie mixte de ces deux biochromes.

Une particularité intéressante du pigment de la zone III réside dans les modifications notables que subissent les spectres d'absorption quand la polarité du solvant varie. C'est ainsi que le maximum d'absorption qui se situe à λ 440 mμ en milieu chloroformique passe à λ 495 mμ quand le solvant utilisé est de l'alcool absolu.

Un décalage analogue des maxima d'absorption se produit avec le pigment jaune orange provenant de la réduction de biochrome vert quand le solvant varie. L'examen spectroscopique des solutions chloroformique et alcoolique avant chromatographie donne des courbes d'absorption dont les maxima sont identiques à ceux du pigment III (λ 440 mμ dans le chloroforme et

Source MNHN, Paris

λ 495 $m\mu$ en milieu alcoolique). Par contre, la solution chloroformique jaune d'or du pigment chromatographié présente un maximum dont la position est quelque peu différente du biochrome de la zone III (λ 452 $m\mu$ au lieu de λ 440 $m\mu$) ; cependant en milieu alcoolique le maximum se situe toujours à λ 495 $m\mu$.

Après avoir filtré le mélange des solutions chloroformiques jaunes des deux pigments sur une colonne d'alumine (qui fixe les biochromes dans sa partie supérieure), du chloroforme, contenant des proportions croissantes d'alcool méthylique, est peu à peu versé sur la colonne. Lorsque la proportion d'alcool atteint 3 %, une zone unique se forme et descend le long de la colonne ; cependant la teinte de cette zone, orange dans le haut, plus rouge vers le bas, n'étant pas uniforme, aucune conclusion ne peut être réellement déduite de cet essai.

Ainsi, bien que l'identité de ces deux pigments jaune orange soit probable, les essais effectués n'ont pu l'établir avec certitude.

2° Pigment de la zone II.

Les propriétés du pigment violet de la zone II sont comparables à celles du biochrome de la zone IV, auquel nous avons donné le nom d'haliotivioline. Il s'agit vraisemblablement de deux pigments isomères, que seule l'analyse chromatographique permet de différencier. Cependant, alors que le biochrome de la zone IV constitue le pigment principal des coquilles d'*Haliotis*, celui de la zone II n'existe qu'en très faible quantité. Les essais de chromatographie mixte sur alumine montrent qu'il s'agit de deux pigments différents, bien que leurs réactions et leurs spectres d'absorption soient identiques.

Les solutions neutres rouge violet deviennent bleu indigo après addition d'acétate de zinc, et bleues ou bleu vert par acidification. Avec l'acide nitrique nitreux, elles passent du bleu au violet et au rouge, sans donner les autres phases de la réaction de Gmelin. Cependant, agitée avec de l'hydrosulfite de sodium et de l'eau distillée, la solution chloroformique, devenue jaune orange, donne avec l'acide nitrique nitreux les phases bleue, violette, rouge et orange du test de Gmelin.

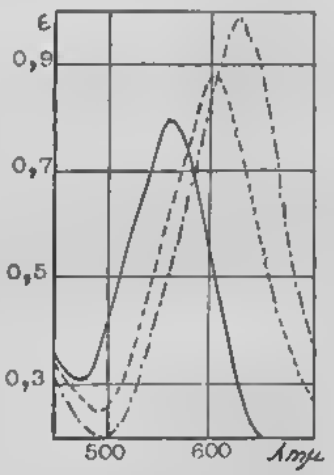


Fig. 13. — Courbes d'absorption du pigment violet, (—) en solution neutre, (-. -.-) en solution acide, (- - -) sel complexe de zinc.

Les courbes d'absorption dans le visible des solutions chloroformiques neutre et acide ont des maxima situés respectivement à λ 560 $m\mu$ et à λ 625 $m\mu$, celle du complexe zincique ayant un maximum à λ 600 $m\mu$ (fig. 13).

Source MNHN, Paris

Ces courbes sont superposables à celles de l'haliotivioline. Par les couleurs de ses solutions, le pigment de la zone II s'apparente aux bilirubinoïdes qui, comme la mésobilivioline, ont une structure bila-diène (a, b) (voir page 64). Cependant, de même que l'haliotivioline, il se différencie des autres violines par l'absence de fluorescence de son complexe zincique. Par réduction de ce pigment à l'aide de poudre de zinc en milieu acétique, il est toutefois possible d'obtenir des produits fluorescents ; la solution acétique bleue, devenue brun rouge puis jaune pâle, redevient, après séparation de la poudre de zinc et agitation à l'air, brun rouge puis violette ; elle présente alors une intense fluorescence rouge.

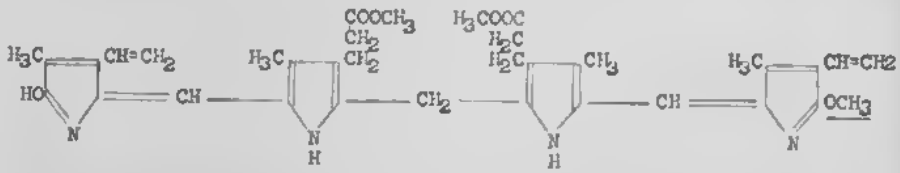
Les réactions indiquées pour le pigment violet de la zone II sont analysées en détail dans l'étude de l'haliotivioline.

3° Pigment de la zone III.

Les solutions chloroformiques du pigment de la zone III sont rouge orange ou jaune d'or suivant leur concentration en biochrome ; les solutions alcooliques sont brun rouge terne. Ce changement de la teinte des solutions, suivant la polarité du solvant, s'accompagne de modifications spectroscopiques.

Avec l'acide nitrique nitreux les solutions de ce pigment passent du jaune au vert, puis au bleu, au violet, au rouge et à l'orange. Ces diverses phases colorées sont identiques à celles données dans les mêmes conditions par les pigments biliaires du groupe des rubines (bilirubine par exemple) ; cependant la phase jaune finale du test de Gmelin fait défaut.

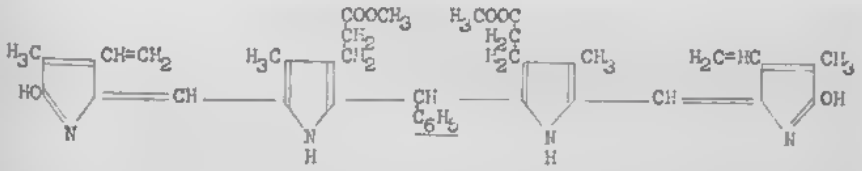
Additionnée d'acétate de zinc et d'iode, la solution chloroformique jaune d'or vire progressivement au vert, puis au bleu (réaction iodozincique). Cette dernière solution présente la couleur et le spectre caractéristique à deux bandes d'absorption des purpurines, mais ne montre pas la fluorescence rouge des complexes zinciques de ces bilirubinoïdes. Cette absence de fluorescence, déjà signalée lors de l'étude du pigment vert de la zone I, est particulière à la série des biobromes des coquilles d'*H. cracherodii*. Elle a également été signalée par H. Fischer pour divers dérivés synthétiques de la bilirubine ; c'est ainsi que les esters méthyliques des bilirubines



dont les groupements — OH en position 1' ou 8' sont remplacés par des méthoxyle — OCH_3 (**124**), ainsi que ceux des bilirubines dont le carbone en b est lié à un noyau benzénique (— CH — au lieu de — CH_2 —) donnent

avec l'acétate de zinc et l'iode des solutions non fluorescentes.

Source MNHN, Paris



Les solutions acides du pigment jaune orange de la zone III deviennent rapidement vertes par oxydation à l'air ; par contre, les solutions neutres sont relativement stables à l'obscurité.

Spectres d'absorption.

Les solutions de ce pigment présentent des particularités spectroscopiques caractéristiques. En effet, suivant la polarité du solvant, les couleurs des solutions sont sensiblement différentes et les spectres présentent un déplacement important des bandes d'absorption. Des modifications comparables de couleurs et de spectres ont déjà été signalées chez les caroténoïdes possédant une fonction cétonique en conjugaison avec une chaîne ayant plusieurs doubles liaisons (rhodoxanthine) (**125**). De telles modifications de spectres n'avaient pas encore été signalées dans la série des pigments biliaires ; elles ne sont d'ailleurs sensibles qu'avec le pigment orange de la zone III, ce qui semble indiquer que la présence d'un carbone saturé au pont b est nécessaire. Ces modifications sont dues, selon toute vraisemblance, à la présence dans les chaînes latérales de groupements cétoniques pouvant s'énoliser. Nous reviendrons ultérieurement sur cette question, au cours de l'interprétation générale de nos observations sur les propriétés des pigments d'*H. cracherodii*.

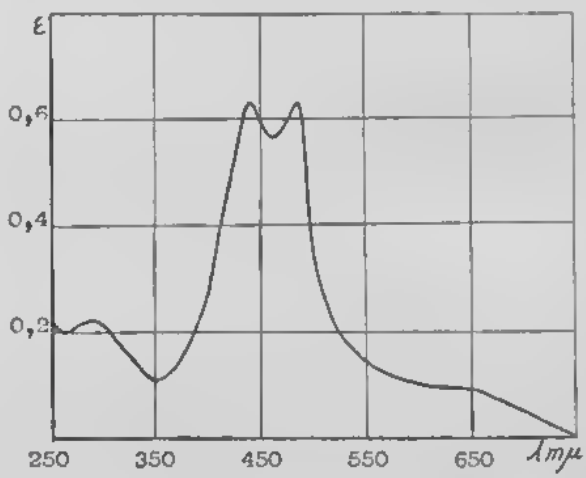


Fig. 14. — Courbe d'absorption du pigment jaune orange dans un mélange de chloroforme et d'alcool méthylique.

Source MNHN, Paris

a) *Solutions neutres*.

La solution jaune d'or recueillie lors de la chromatographie du pigment présente dans l'ultra-violet une bande d'absorption à λ 285 $m\mu$ et dans le visible deux bandes d'égale intensité, dont les maxima se situent à λ 442 $m\mu$ et à λ 480 $m\mu$ (fig. 14). La présence de deux bandes d'absorption dans le visible est due au fait que le solvant est un mélange de chloroforme et d'alcool méthylique. En effet, la solution jaune d'or, obtenue en dissolvant 250 γ de pigment dans 10 cm^3 de chloroforme, possède une courbe d'absorption ne présentant plus que deux maxima, l'un à λ 270 $m\mu$, l'autre à λ 440 $m\mu$ (ε sp = 26), cependant une inflexion subsiste à λ 475 $m\mu$. De même la solution alcoolique brun rouge, de concentration identique, montre deux

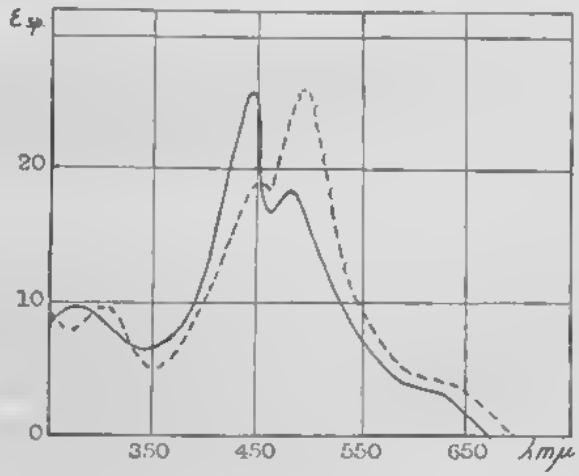


FIG. 15. — Courbe d'absorption du pigment jaune orange (—) dans le chloroforme, (- - -) dans l'alcool absolu.

maxima l'un à λ 300 $m\mu$ et l'autre à λ 495 $m\mu$ (ε sp = 26), ainsi qu'un accident à λ 445 $m\mu$ (fig. 15).

Ainsi, suivant le solvant employé, les positions des maxima varient ; il suffit d'ailleurs de diluer la solution chloroformique avec de l'alcool absolu pour provoquer un affaiblissement de la bande à λ 440 $m\mu$ et le développement de la bande à λ 495 $m\mu$; l'addition de chloroforme à la solution alcoolique provoque le phénomène inverse. Il semble exister un état d'équilibre entre deux structures chimiques différentes, probablement entre une fonction cétonique et sa forme énolique.

L'énolisation d'une fonction cétonique en présence d'un solvant polaire entraîne la formation d'une double liaison entre deux atomes de carbone. Or, la présence de doubles liaisons dans les chaînes latérales des pigments biliaires provoque un décalage des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'ondes ; le déplacement vers le rouge des maxima d'absorption du pigment jaune orange en milieu alcoolique s'expliquerait ainsi par l'appa-

Source MNHN, Paris

rition de doubles liaisons, due à l'énolisation d'une ou de plusieurs fonctions cétoniques, contenues dans des chaînes latérales. Notons que le maximum de la solution chloroformique du pigment de la zone III se situe dans la même région du spectre que celui de la bilirubine (maximum vers λ 450 $m\mu$).

b) *Solutions acides* :

Additionnée de deux gouttes d'alcool méthylique chlorhydrique, la solution chloroformique jaune d'or passe au jaune vert, mais ne présente pas de modification spectroscopique sensible. La courbe d'absorption dans le visible possède un maximum à λ 440 $m\mu$ et une inflexion à λ 480 $m\mu$; en

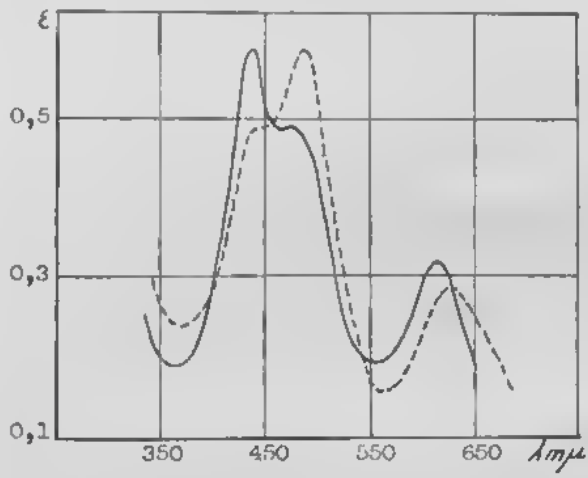


Fig. 16. — Courbes d'absorption du pigment jaune orange en milieu acide (—) dans le chloroforme, (- - -) dans l'alcool absolu.

outre apparaît une nouvelle bande à λ 612 $m\mu$, due à la présence du pigment vert (fig. 16).

La solution alcoolique acidifiée présente un verdissement plus intense, mais son spectre d'absorption reste comparable à celui de la liqueur neutre, le maximum principal se situant à λ 495 $m\mu$. La présence d'une bande d'absorption à λ 630 $m\mu$ est due à l'oxydation partielle du pigment en verdine (fig. 16) (voir page 64).

c) *Sels de zinc* :

Après addition de quelques gouttes d'une liqueur alcoolique d'acétate de zinc à 1 %, la solution jaune d'or, provenant directement de la chromatographie, passe au rouge cerise. Elle présente trois bandes d'absorption dont les maxima se situent respectivement à λ 460 $m\mu$, λ 495 $m\mu$ et λ 535 $m\mu$ (fig. 17). Le solvant employé au cours de la chromatographie étant un mélange de chloroforme et d'alcool, le spectre obtenu correspond à une superposition des bandes d'absorption observées soit avec le chloroforme pur, soit

Source : MNHN, Paris

avec l'alcool absolu. En effet, le spectre du complexe zincique en solution chloroformique est caractérisé par deux bandes, l'une principale à λ 460 $m\mu$,

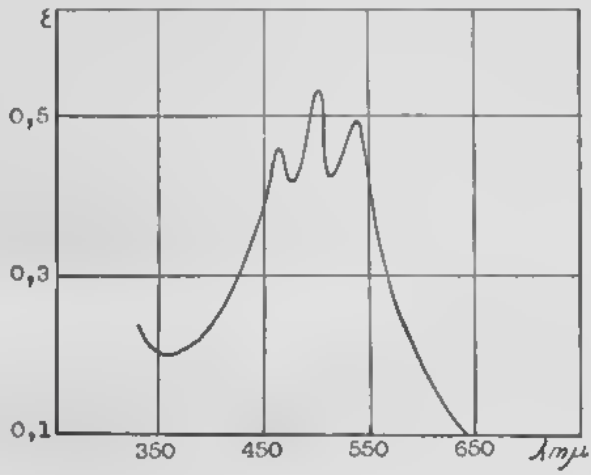


Fig. 17. — Courbe d'absorption du pigment jaune orange dans un mélange de chloroforme et d'alcool méthylique après addition d'acétate de zinc.

l'autre secondaire à λ 532 $m\mu$. Par contre, en milieu alcoolique, le maximum principal se situe à λ 490 $m\mu$ et le maximum secondaire à λ 535 $m\mu$ (fig. 18).

Ainsi l'influence du solvant sur les spectres du pigment de la zone III se

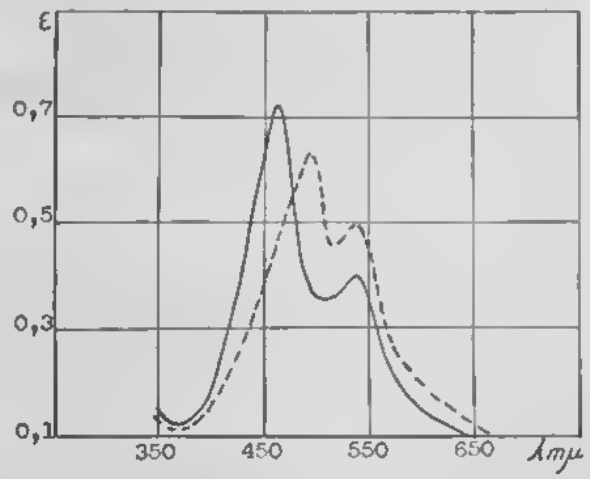


Fig. 18. — Courbes d'absorption du pigment jaune orange après addition d'acétate de zinc (—) dans le chloroforme, (- - -) dans l'alcool absolu.

manifeste aussi bien en milieu neutre ou acide qu'en présence du complexe zincique. Signalons que A. Comfort a fait paraître récemment (**123**) une note succincte sur un pigment jaune des coquilles d'*H. cracherodii* ; ce

Source MNHN, Paris

biochrome, isolé par chromatographie sur talc, montre certaines analogies spectroscopiques avec notre produit jaune orange, dont il se distingue cependant par la fluorescence orange de son complexe zincique.

Additionnée de quelques gouttes d'une solution alcoolique d'iode à 1 %, la liqueur alcoolique du complexe zincique devient verte puis bleue. Elle présente le spectre caractéristique à deux bandes des sels de zinc des purpurines, l'une principale à λ 665 $m\mu$, l'autre plus faible à λ 615 $m\mu$ (fig. 19). Ce spectre est identique à celui, observé dans les mêmes conditions, avec le pigment vert de la zone I ; aucune fluorescence n'est visible en lumière ultra-violette. Cette identité des spectres est en faveur de la filiation de ces deux bilirubinoïdes.

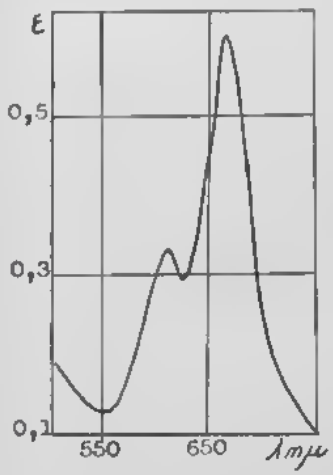


FIG. 19. — Courbe d'absorption du pigment jaune orange après addition d'acétate de zinc et d'iode.

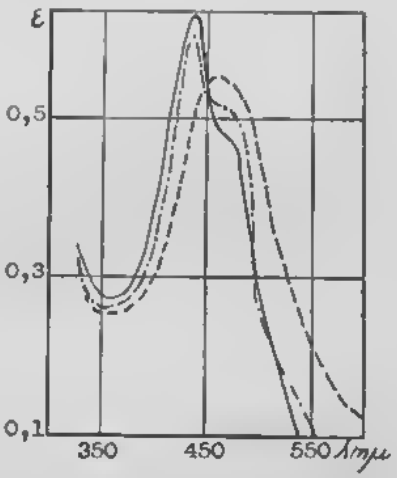


FIG. 20. — Courbes d'absorption du pigment jaune orange d'*H. rufescens*, (—) solution chloroformique neutre, (-.-.-) solution chloroformique acide, (- - -) sel de zinc.

Dans une recherche fragmentaire sur les pigments d'*Haliotis rufescens*, nous avons isolé par chromatographie sur alumine un pigment vert, dont nous avons parlé antérieurement, et un biochrome jaune orange. La solution chloroformique de ce dernier est jaune d'or ; elle montre les mêmes phases colorées de la réaction de Gmelin que le pigment de la zone III. Avec l'acétate de zinc et l'iode, elle donne également une liqueur bleue non fluorescente. Les courbes d'absorption des solutions chloroformiques neutre et acide présentent un maximum à λ 440 $m\mu$ et une inflexion vers λ 480 $m\mu$ (fig. 20). Le maximum du complexe zincique se situe à λ 460 $m\mu$. Cette étude préliminaire permet de déceler de grandes analogies entre les pigments jaune orange d'*H. rufescens* et d'*H. cracherodii*.

4° Pigment de la zone IV.

Ayant séparé ce pigment par chromatographie, puis par précipitation

Source MNHN, Paris

sous forme de chlorhydrate, l'ayant à nouveau chromatographié puis précipité par l'éther de pétrole, nous pensons l'avoir obtenu à l'état pur et nous proposons de lui donner le nom d'HALIOTIVIOLINE. Signalons que certains pigments biliaires, par exemple la bilifuscine et la mésobilifuscine, n'ont pu être ni isolés, ni synthétisés à l'état cristallisé.

L'haliotivioline, isolée sous forme d'ester méthylique, est très soluble dans l'alcool méthylique et le chloroforme, peu soluble dans l'éther, insoluble dans l'éther de pétrole. Ces solubilités sont comparables à celles des esters méthyliques des pigments biliaires.

Les analyses élémentaires, effectuées, les unes à Oxford, les autres à Zurich, sur des produits provenant de deux préparations différentes, ont fourni les résultats suivants :

1° pour C et H :

Prise d'essai en mg.	H_2O en mg.	CO_2 en mg.
3,745	2,180	8,370
3,816	2,050	8,466

C %	H %
60,96	6,5
60,54	6,01

2° pour N :

Prise d'essai en mg.	Volume d'N en cm^3	N %
3,281	0,219	7,35

Les chiffres trouvés C % : 60,96 et 60,54 ; H % 6,5 et 6,01 ; N % 7,35 s'accordent avec les formules :

$C_{38}H_{44}O_{12}N_4$, calculé : C % 60,93 ; H % 5,92 ; N % 7,48 ;
$C_{39}H_{46}O_{12}N_4$, calculé : C % 60,77 ; H % 6,18 ; N % 7,46 ;
$C_{38}H_{48}O_{12}N_4$, calculé : C % 60,61 ; H % 6,43 ; N % 7,44 ;
$C_{39}H_{46}O_{12}N_4$, calculé : C % 61,38 ; H % 6,08 ; N % 7,34 ;
$C_{39}H_{46}O_{12}N_4$, calculé : C % 61,23 ; H % 6,33 ; N % 7,32.

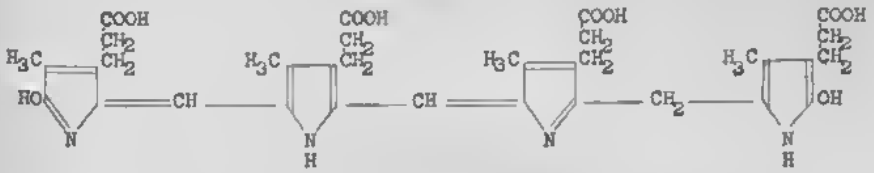
Le dosage des groupements méthoxyle, effectué sur une prise de 1,093 mg., donne une teneur de 11,87 %. Ce dosage indique la présence de trois groupes carboxyliques dans l'haliotivioline. Cependant nous pensons que la teneur trouvée est trop faible et nous accordons plus de crédit à l'analyse chromatographique sur papier qui indique la présence de quatre groupements carboxyliques.

Les formules sont voisines de celle de l'ester méthylique d'une copromésobilivioline : $C_{39}H_{46}O_{10}N_4$; elles s'en distinguent cependant par la présence de 12 atomes d'oxygène au lieu de 10 pour une copromésobilivioline.

Afin de savoir si l'haliotivioline avait bien une constitution tétrapyrro-

Source MNHN, Paris

lique, nous avons essayé d'en déterminer le poids moléculaire selon le procédé de K. Rast, en employant la technique suivante : 0,62 mg. de pigment et 9,07 mg. de camphre sont pesés à la microbalance dans un tube de 3 mm. de large et de 20 mm. de long ; après avoir été scellé, le tube, fixé à l'extrémité d'un agitateur, est plongé entièrement dans un bain d'huile à 180°,



Coprom ésobilivioline I.

puis agité par rotation de façon à homogénéiser le mélange fondu ; après refroidissement, le tube est ouvert, puis le mélange introduit dans des tubes capillaires, à l'intérieur desquels il se répartit sous forme de fins copeaux ; les tubes capillaires scellés sont prêts pour l'examen du point de fusion. Le mélange fondu étant trop coloré pour pouvoir déterminer le point de fusion par transparence, nous avons noté l'instant où le mélange commence à couler le long des parois (171°5) et le moment où tout le liquide se rassemble au fond du tube capillaire (172°). L'abaissement de température observé entre le point de fusion du camphre utilisé (176°5) et celui du mélange est compris entre 4°5 et 5°, ce qui indique que le poids moléculaire de l'haliotivioline se situe entre 720 et 800. Ces chiffres sont en accord avec les formules proposées : calculé pour $C_{38}H_{46}O_{12}N_4$: 750, et pour $C_{39}H_{48}O_{12}N_4$: 764.

Les teneurs en C, H et N de l'haliotivioline sont voisines de celles trouvées pour la turboglaucobiline : C % 59,46 et 59,72 ; H % 6,22 et 6,31 ; N % 7,52. Ces deux pigments possèdent 12 ou 13 atomes d'oxygène dans leur molécule et semblent appartenir, non à une même série, mais à deux familles voisines de bilirubinoïdes. En effet, alors que la turboglaurobiline possède toutes les propriétés des pigments biliaires, ayant une structure bila-triène, l'haliotivioline et les autres biochromes d'*H. tracherodii* se distinguent nettement des autres bilirubinoïdes connus.

Les solutions neutres de l'haliotivioline sont rouge violet, ses solutions acides bleues ; elles ne présentent les unes et les autres aucune fluorescence nette en lumière ultra-violette. Le pigment est partiellement enlevé à sa solution chloroformique par les acides dilués ; ce phénomène, également observé avec les pigments des coquilles de *Turbo*, ne se produit pas avec les biochromes de la série bilirubinique.

Avec l'acide nitrique nitreux, la solution chloroformique acide bleue vire au violet et au rouge ; elle ne donne pas les phases ultérieures orange et jaune de la réaction de Gmelin.

Additionnée d'acétate de zinc, la solution chloroformique neutre passe au bleu indigo, mais elle ne montre aucune fluorescence en lumière ultra-vio-

Source MNHN, Paris

lette. Cette absence de fluorescence, commune à tous les pigments d'*H. cracherodii*, distingue l'haliotivioline des bilirubinoïdes du groupe des violines, dont les sels de zinc présentent une intense fluorescence rouge. Cependant, ainsi que nous le verrons ultérieurement, l'étude des produits d'oxydation et de réduction de l'haliotivioline confirme la nature tétrapyrrolique et la structure bila-diène (a, b) de ce pigment (voir page 64).

Spectres d'absorption.

a) *Solutions neutres* :

L'examen au spectrophotomètre de Beckman d'une solution d'haliotivioline (17 γ par cm³) dans l'alcool absolu montre l'existence de trois bandes

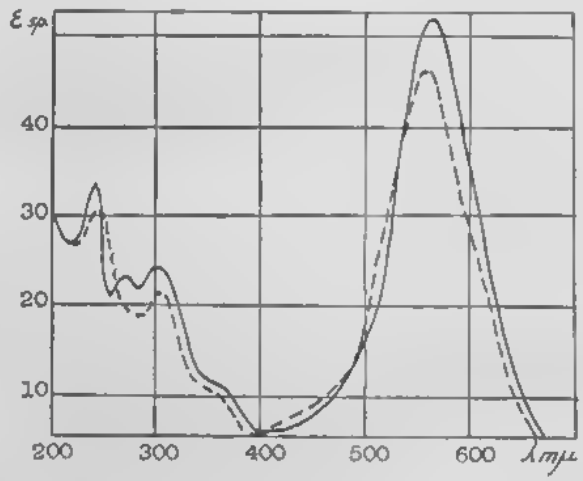


Fig. 21. — Courbes d'absorption de l'haliotivioline, (—) dans l'alcool absolu, (· · ·) dans le chloroforme.

d'absorption dans l'ultra-violet (fig. 21). Le maximum de la bande principale se situe à λ 240 $m\mu$ (ε sp = 33) et les maxima des deux bandes secondaires à λ 270 $m\mu$ (ε sp = 23) et à λ 300 $m\mu$ (ε sp = 24). La solution chloroformique présente également une bande principale à λ 245 $m\mu$ (ε sp = 30), mais une seule bande secondaire à λ 305 $m\mu$ (ε sp = 21) (fig. 21).

Les maxima des courbes d'absorption dans le visible se trouvent respectivement à λ 560 $m\mu$ (ε sp = 53) pour la solution alcoolique et à λ 555 $m\mu$ (ε sp = 47) en milieu chloroformique (fig. 21). Rappelons que le coefficient d'extinction spécifique est calculé d'après la formule : $\varepsilon \text{ sp} = \frac{1}{cd}\,\delta$, où c est la concentration de pigment en grammes par litre, d l'épaisseur de la cuve et δ la densité optique.

b) *Solutions acides* :

Le précipité du chlorhydrate d'haliotivioline, obtenu par passage de gaz

Source MNHN, Paris

chlorhydrique sec dans un mélange de chloroforme et d'éther, est lavé à à l'éther puis séché sous vide. Ses solutions (9 γ par cm³) alcoolique bleue et chloroformique bleu-vert ne présentent aucune bande d'absorption caractéristique dans l'ultra-violet, mais seulement des inflexions vers λ 280 m_μ et λ 310 m_μ ou λ 320 m_μ (fig. 22). Dans le visible les courbes d'absorption, identiques par les deux solvants (alcool et chloroforme), montrent un maximum à λ 625 m_μ (ε sp $\simeq$ 52 et 50) (fig. 22).

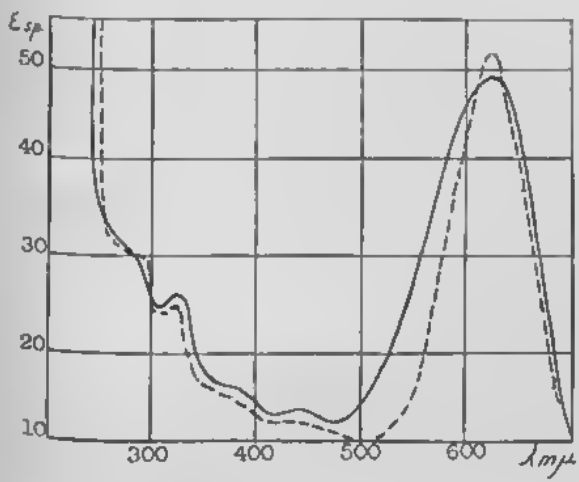


FIG. 22. — Courbes d'absorption du chlorhydrate de l'haliotivioline, (—) dans le chloroforme, (- - -) dans l'alcool absolu.

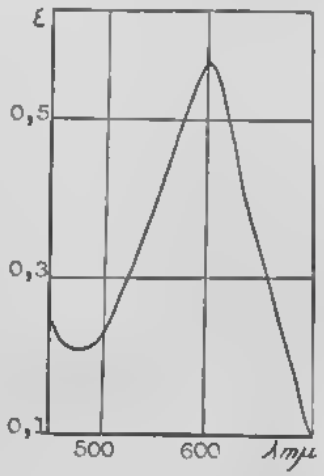


FIG. 23. — Courbe d'absorption du complexe zincique de l'haliotivioline.

c) *Sel complexe de zinc* :

Si quelques gouttes d'une liqueur alcoolique d'acétate de zinc à 1 % sont ajoutées à la solution chloroformique neutre, cette dernière vire au bleu indigo et présente alors dans le visible une courbe d'absorption dont le maximum se situe à λ 603 m_μ (fig. 23).

Les caractéristiques de la mésobilivioline (**83**) et de l'haliotivioline sont données dans le tableau suivant :

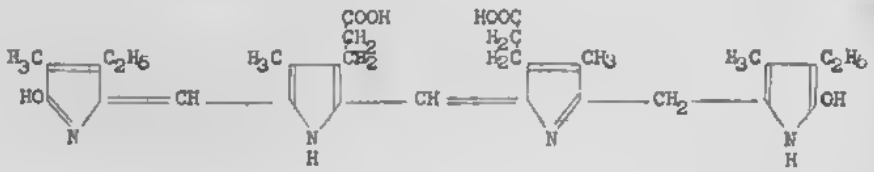
Composé	Solvant	Couleur	Max. d'absorption
Mésobilivioline	chloroforme	violet-rouge	λ 570 m_μ
» (chlorhydrate)	chloroforme	bleu	λ 607 m_μ
» (sel de zinc)	méthanol	bleu (fluo. rouge)	λ 625 m_μ
			λ 575 m_μ
Haliotivioline	chloroforme	violet-rouge	λ 560 m_μ
» (chlorhydrate)	chloroforme	bleu-vert	λ 625 m_μ
» (sel de zinc)	chloroforme	bleu indigo (pas de fluo.)	λ 603 m_μ

Source MNHN, Paris

Les bandes d'absorption de ces deux pigments se situent dans les mêmes régions du spectre ; cependant, alors que les maxima des complexes zinciques de l'haliotivioline et de la mésobilivioline se trouvent respectivement à λ 603 mμ et λ 625 mμ, ceux des solutions acides sont inversement à λ 625 mμ pour le premier de ces pigments et à λ 607 mμ pour le second.

Oxydation.

Le fait que le pigment principal d'*Haliotis cracherodii* ne donnait pas une réaction de Gmelin typique a été invoqué par A. Comfort (**122**) pour justifier la nature indigotique de ce biochrome, le produit final de la réaction présentant un spectre comparable à celui de l'uroroséine. En réalité, cette



Mésobilivioline IX_α.

observation ne peut être invoquée contre la nature tétrapyrrolique de l'haliotivioline, car les bilirubinoïdes du groupe des violines ne donnent pas la réaction de Gmelin. C'est ainsi que la mésobilivioline s'oxyde en oxo-urobiline, dont les propriétés sont comparables à celles de l'urobiline (couleurs des solutions, spectres, fluorescence verte du complexe zincique) (**83**).

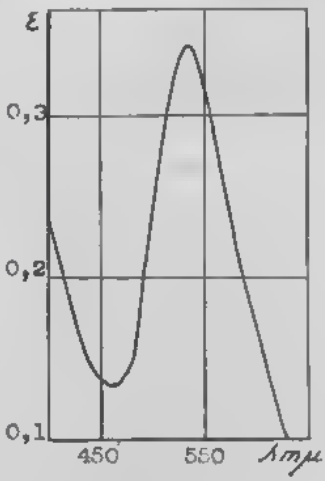


Fig. 24. — Courbe d'absorption de l'hallotivioline oxydée (en milieu acide).

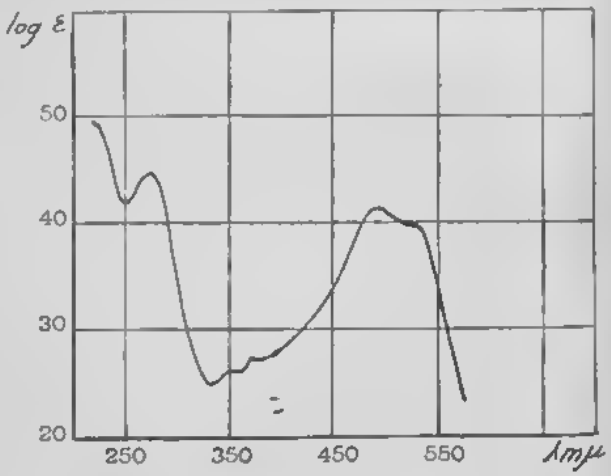


Fig. 25. — Courbe d'absorption du sulfate d'uroroséine d'après W. R. Fearon et W. A. Boggust.

Additionnées d'acide nitrique, les solutions d'haliotivioline virent au violet, puis au rouge. Après neutralisation, ces solutions, devenues oranges,

Source MNHN, Paris

donnent avec l'acétate de zinc un complexe rouge cerise non fluorescent. Ainsi que nous l'avons déjà signalé, l'absence de fluorescence des sels complexes est particulière à cette série de pigments.

La solution acide rouge présente une courbe d'absorption dont le maximum se situe à λ 530 m_μ (fig. 24). Cette courbe est comparable à celle donnée par A. Comfort (**122**) pour le dérivé rouge du pigment d'*Haliotis*, elle est différente de celle établie par W. R. Fearon et W. A. Boggust (**126**) pour le sulfate d'urorosèine (maximum principal à λ 484 m_μ et maximum secondaire à λ 535 m_μ (fig. 25). En outre l'urorosèine ne donne pas de complexe zincique et ses propriétés générales sont nettement différentes de celles des pigments biliaires. Il nous semble aventureux d'attribuer une structure indigotique au pigment principal d'*H. cracherodii* en se basant uniquement sur quelques vagues analogies de spectres, alors que toutes les propriétés de ce pigment sont en accord avec une structure tétrapyrrolique. Il nous paraît plus vraisemblable d'assimiler le produit d'oxydation rouge de l'haliotivioline à une oxo-urobiline, malgré l'absence de fluorescence du complexe zincique.

Réduction.

1° *Réduction avec l'hydrosulfite de sodium :*

Cette réduction, qui conduit à un pigment jaune orange, identique à celui de la zone III, apporte une nouvelle preuve de la nature tétrapyrrolique de l'haliotivioline.

Agitée avec de l'hydrosulfite de sodium et de l'eau distillée, la solution chloroformique bleu-vert du chlorhydrate d'haliotivioline vire rapidement au jaune-vert, puis au jaune orange. Après décantation, la couche chloroformique est lavée à l'eau distillée, puis avec une liqueur alcaline décinormale. Elle est ensuite filtrée sur une colonne d'alumine, qui fixe les pigments dans sa portion supérieure. Lorsque la proportion d'alcool méthylique, ajoutée au chloroforme, est de 3 %, une zone rouge orange principale se détache et descend, tandis que le pigment violet, non transformé, reste fixé en haut de la colonne, la solution jaune d'or, qui filtre, est recueillie, puis distillée sous vide.

La solution alcoolique du résidu d'évaporation est d'une teinte brun rouge terne ; la solution chloroformique concentrée est rouge orange, diluée elle devient jaune d'or.

Avec l'acide nitrique nitreux, les solutions passent du jaune au vert, puis au bleu, au violet, au rouge et à l'orange, donnant ainsi les mêmes phases colorées du test de Gmelin que le pigment de la zone III.

Additionnée d'acétate de zinc et d'iode, la solution chloroformique jaune d'or vire progressivement au vert, puis au bleu. Bien que présentant la couleur et le spectre à deux bandes des complexes zinciques des purpurines, cette liqueur ne montre aucune fluorescence rouge. Cette absence de fluo-

Source MNHN, Paris

rescence au cours de la réaction iodo-zinrique a déjà été signalée pour le pigment jaune orange de la zone III et pour le biochrome vert de la zone I. Par acidification la liqueur bleue devient violette, montrant ainsi la couleur des solutions acides des purpurines (phase violette de la réaction de Gmelin).

Spectres d'absorption :

Les solutions de ce pigment jaune orange montrent des modifications spectroscopiques identiques à celles observées avec le biochrome de la zone III, quand la polarité du solvant varie. C'est ainsi que la solution chloroformique jaune d'or possède une bande principale dont le maximum se situe à λ 440 $m\mu$ et une inflexion à λ 480 $m\mu$ (fig. 26), tandis que la courbe d'absorption du pigment dans l'alcool absolu montre un maximum à λ 495 $m\mu$ et seulement un accident à λ 445 $m\mu$ (fig. 26).

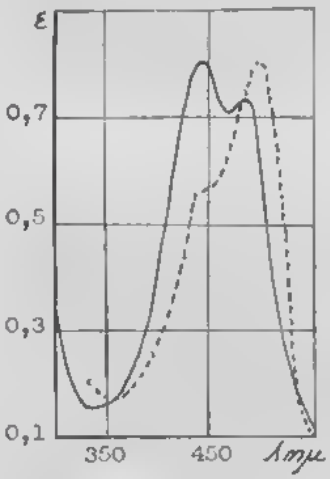


FIG. 26. — Courbes d'absorption du pigment jaune orange, provenant de la réduction de l'haliotivioline, (—) dans le chloroforme, (- - -) dans l'alcool.

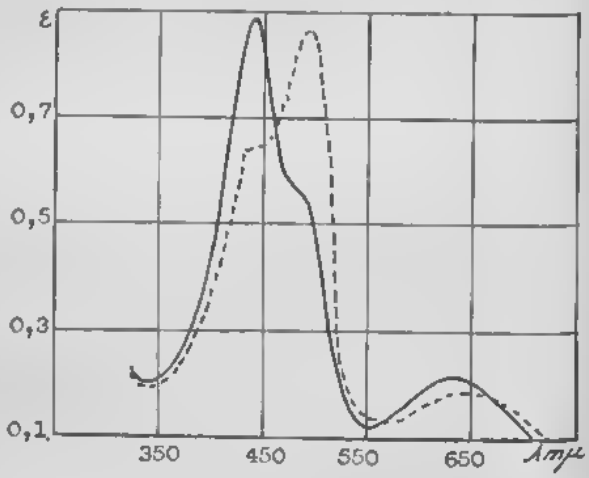


FIG. 27. — Courbes d'absorption du pigment jaune orange, provenant de la réduction de l'haliotivioline a solutions acides (—) chloroformique, (- - -) alcoolique.

Le spectres des solutions acides jaune-vert sont comparables à ceux obtenus en milieu neutre : les maxima des courbes d'absorption se situant respectivement à λ 440 $m\mu$ pour la liqueur chloroformique et à λ 495 $m\mu$ quand le solvant est de l'alcool absolu (fig. 27). L'amorce d'une nouvelle bande dans la région rouge du spectre est due à la formation du pigment vert.

Les changements de coloration et de spectres, provoqués par l'addition d'acétate de zinc aux solutions neutres de ce pigment, sont identiques à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec le biochrome de la zone III. Les maxima des courbes d'absorption se situent respectivement à λ 460 $m\mu$ et λ 530 $m\mu$ pour la solution chloroformique et à λ 490 $m\mu$ et λ 535 $m\mu$ en milieu alcoolique (fig. 28). L'addition d'une goutte d'alcool méthylique aux

Source MNHN, Paris

solutions du complexe zincique provoque le virage de la teinte rouge au jaune-vert avec apparition des spectres des liqueurs acides.

La réaction iodo-zincique donne des résultats également identiques à ceux observés avec le pigment de la zone III : passage progressif de la teinte rouge au vert et au bleu, apparition d'un spectre caractérisé par les deux bandes d'absorption des complexes zinciques des purpurines, absence de fluorescence rouge. Le maxima principal se trouve à λ 665 $m\mu$ et le maximum secondaire à λ 615 $m\mu$ (fig. 29).

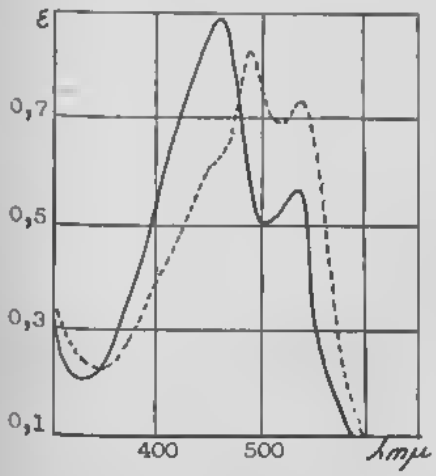


Fig. 28. — Courbes d'absorption du pigment jaune orange, provenant de la réduction de l'haliotivioline : complexe zincique (—) dans le chloroforme, (- - -) dans l'alcool.

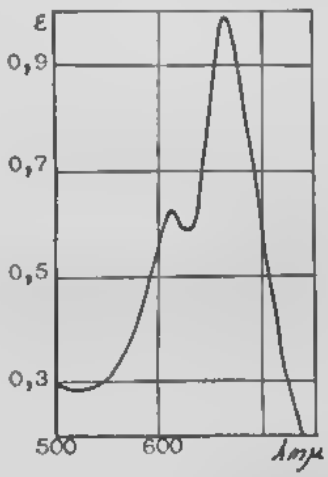


Fig. 29. — Courbes d'absorption du pigment jaune orange provenant de la réduction de l'haliotivioline (complexe zincique oxydé par l'iode).

Chromatographie mixte :

Les propriétés du pigment jaune orange, obtenu par réduction de l'haliotivioline, étant analogues à celles du biochrome de la zone III, nous avons procédé à un essai de chromatographie mixte pour vérifier l'identité de ces deux bilirubinoïdes.

Après avoir préparé trois colonnes d'alumine identiques, nous avons chromatographié sur l'une la solution chloroformique du pigment de la zone III, sur l'autre celle du pigment jaune orange provenant de la réduction de l'haliotivioline, enfin sur la dernière le mélange de ces deux biochromes. Dans les trois cas les pigments sont retenus à la partie supérieure des colonnes d'alumine en une zone rouge orange. Du chloroforme, contenant des proportions croissantes d'alcool méthylique, est versé sur chaque colonne. Lorsque la teneur du chloroforme en alcool atteint 3 %, le pigment chemine dans les trois colonnes en une zone unique, située à un même niveau. Ainsi l'essai de chromatographie mixte confirme l'identité du produit de réduction de l'haliotivioline avec le pigment de la zone III.

Source MNHN, Paris

2° *Réduction avec le zinc et l'acide acétique* :

L'une des objections, qui pourrait être formulée contre la nature tétrapyrrolique de l'haliotivioline, est l'absence de fluorescence du complexe zincique de ce pigment. *Or, il est possible d'obtenir, à partir de l'haliotivioline, des produits dont les sels de zinc présentent les fluorescences typiques des complexes des pigments biliaires.*

La solution acétique bleue du chlorhydrate d'haliotivioline, contenant de la poudre de zinc, est chauffée avec précaution de façon à provoquer le dégagement d'hydrogène. Peu à peu la solution passe au vert, au brun rouge, puis au jaune pâle. Après filtration, la solution se réoxyde instantanément par agitation à l'air et peu à peu vire au brun rouge, puis au rouge violet, en même temps *apparaît une intense fluorescence orange.*

Après extraction des pigments à l'aide de chloroforme, la solution violette obtenue est lavée à l'eau distillée pour éliminer les traces de zinc, puis avec une liqueur alcaline et finalement à l'eau distillée. La solution chloroformique devenue rouge ne présente plus aucune fluorescence.

Après adsorption des pigments sur alumine, le chromatogramme est développé à l'aide de chloroforme, contenant 1 % d'alcool méthylique. Une zone violette se détache et chemine le long de la colonne d'alumine, suivie d'une zone orange. Lorsque ces zones colorées atteignent successivement le bas de la colonne, les liquides colorés correspondants sont recueillis. Nous obtenons ainsi en premier lieu une solution rouge violet, puis une liqueur orange. Ces solutions non fluorescentes montrent, après addition d'acétate de zinc, la première, une intense fluorescence rouge, la seconde une fluorescence verte. En milieu acide, l'une conserve sa fluorescence rouge, l'autre présente une fluorescence orange.

Les spectres des solutions du pigment rouge violet sont comparables à ceux de l'haliotivioline, dont ils ne diffèrent que par les positions des maxima, qui se trouvent décalés d'environ 20 $m\mu$ vers les courtes longueurs d'ondes. Les maxima des courbes d'absorption se situent en effet à λ 540 $m\mu$ pour les solutions neutres, à λ 600 $m\mu$ pour les solutions acides bleu-violet et à λ 580 $m\mu$ pour le complexe zincique violet (fig. 30).

Ce pigment, dont le sel de zinc présente une intense fluorescence rouge, possède vraisemblablement une constitution chimique très voisine de celle de l'haliotivioline, puisque les spectres d'absorption restent comparables. Par ailleurs, il s'apparente étroitement aux pigments biliaires possédant une structure bila-diène (a, b) (voir page 64), telle que la mésobilivioline, dont il se distingue cependant par ses spectres d'absorption.

Par contre, les solutions du pigment orange montrent de grandes analogies avec celles de l'urobiline, dont les bandes d'absorption se situent dans la même région du spectre. Les courbes d'absorption des solutions neutre (rouge orange) et acide (rose) possèdent un maximum à λ 505 $m\mu$; le maximum du complexe zincique à fluorescence verte se situe à λ 482 $m\mu$ (fig. 31).

Source : MNHN, Paris

De même que dans le cas de l'haliotivioline, le maximum d'absorption du sel de zinc du pigment orange se trouve décalé vers les courtes longueurs d'ondes par rapport à celui de la solution acide. C'est le phénomène inverse qui est observé dans le cas de la mésobilivioline d'une part et de l'urobiline d'autre part. Les maxima d'absorption de l'urobiline sont en effet vers λ 490 $m\mu$ pour les solutions acides et vers λ 510 $m\mu$ pour le sel complexe de zinc. Enfin, de même que pour le pigment de la zone III, les solutions neutre et acide ont des spectres identiques.

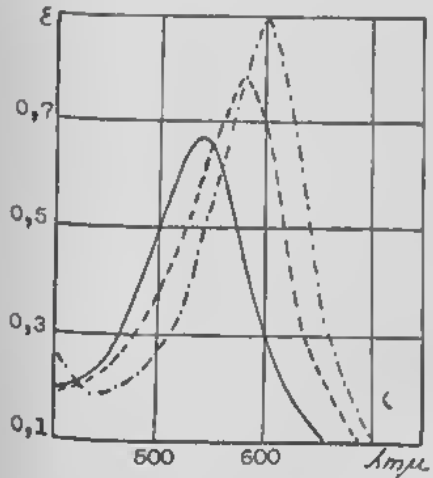


FIG. 30. — Courbes d'absorption du pigment rouge violet provenant de la réduction de l'haliotivioline (—) solution neutre, (- .- . -) solution acide, (- - -) complexe de zinc.

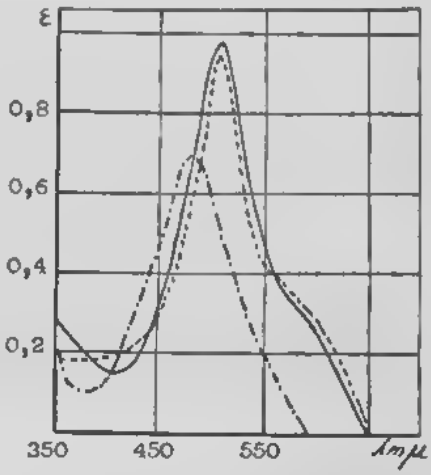


FIG. 31. — Courbes d'absorption du pigment orange provenant de la réduction de l'haliotivioline, (—) solution neutre, (- - -) solution acide, (-. -. -) complexe zincique.

Ainsi par réduction, puis réoxydation spontanée à l'air, l'haliotivioline conduit à des pigments dont les sels de zinc sont fluorescents. Cette observation apporte une preuve supplémentaire de la structure tétrapyrrolique de l'haliotivioline et de sa parenté chimique avec les bilirubinoïdes du groupe des violines.

5° Pigment de la zone V.

Après séparation des pigments correspondant aux zones antérieures, il est possible d'obtenir de nouvelles zones colorées en lavant la colonne d'alumine à l'aide de chloroforme, contenant des proportions croissantes d'alcool méthylique (5 puis 10 %). Les solutions rouge et violette, recueillies au bas de la colonne, ne sont que des mélanges de pigments, d'ailleurs à l'état de traces. Additionnée d'acétate de zinc, la solution rouge présente, après virage au violet, une fluorescence verte ; acidifiée, elle prend une teinte verte. Les maxima d'absorption des solutions neutre et acide se situent respectivement à λ 475 $m\mu$ et λ 625 $m\mu$, celui du complexe zincique à

Source MNHN, Paris

λ 605 mμ. Ces spectres sont comparables à ceux de l'haliotivioline. Ainsi, à côté des pigments principaux, étudiés antérieurement, dont l'une des caractéristiques est de donner des complexes zinciques non fluorescents, il existe des traces d'un biochrome dont le sel de zinc présente une intense fluorescence verte.

c) *CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER*

R. E. H. Nicholas et C. Rimington, appliquant la chromatographie de partage sur papier à l'étude des porphyrines (**78**, **79**), préconisent l'emploi du système lutidine-eau en présence de vapeurs ammoniacales. L'emplacement des taches colorées sur la bande de papier (Whatman n° 1) dépend du nombre de groupes carboxyliques des porphyrines étudiées, le Rf (rapport entre la distance parcourue par la porphyrine et celle parcourue par le solvant) étant inversement proportionnel au nombre des fonctions acides. Quelques-unes des valeurs de Rf, trouvées par ces auteurs pour des porphyrines à nombre différent de groupes carboxyliques, sont reportées dans le tableau suivant :

Porphyrines	Nb de groupes carboxyliques	Valeurs de Rf
Uroporphyrine	8	0,3
Coproporphyrine	4	0,6
Protoporphyrine	2	0,8
Deutéroporphyrine	2	0,8
Mésoporphyrine.	2	0,8
Hématoporphyrine	2	0,8
Porphyrines estérifiées.	0	1,0

R. E. H. Nicholas et C. Rimington donnent quelques exemples d'application de leur technique à l'examen des porphyrines contenues dans des milieux naturels ou des liquides pathologiques. Cette méthode est également utilisée par R. E. H. Nicholas et A. Comfort (**80**) pour l'étude des porphyrines des coquilles de diverses espèces de Mollusques. Préalablement purifiées par adsorption sur talc, puis éluées avec de l'ammoniaque 10 N, les porphyrines sont disposées sur la bande de papier. Des traces de coproporphyrine peuvent ainsi être décelées, à côté de l'uroporphyrine, dans les coquilles de *Pinctada vulgaris*. Les valeurs de Rf données par R. E. H. Nicholas et A. Comfort sont pour la protoporphyrine de 0,75, pour la coproporphyrine de 0,5 et pour l'uroporphyrine de 0,07 (0,12), cette dernière porphyrine donnant deux taches colorées.

L'application de la chromatographie de partage sur papier aux pigments biliaires nous semble devoir fournir d'utiles renseignements sur la constitution chimique d'un grand nombre de bilirubinoïdes naturels, dont l'étude est rendue délicate par le manque de matière première.

L'intérêt de cette technique réside dans le fait qu'il suffit de quelques

Source : MNHN, Paris

gamma de substance pour : 1° déterminer le Rf du pigment étudié et avoir ainsi une caractéristique pouvant servir à son identification ; 2° connaître le nombre de groupes carboxyliques contenus dans sa molécule ; 3° vérifier son homogénéité, cette technique permettant non seulement de distinguer la présence de biochromes à nombre de groupes carboxyliques différents, mais dans certains cas de séparer des bilirubinoïdes voisins (bilirubine et biliverdine par exemple).

En premier lieu, nous avons chromatographié diverses porphyrines et comparé nos résultats à ceux des auteurs précédents. Nous étant ainsi assuré de la valeur de la technique employée, nous avons chromatographié simultanément des porphyrines (protoporphyrine et mésoporphyrine) et des pigments biliaires (bilirubine et biliverdine) ayant un nombre identique de radicaux propanoïques. Ces essais ayant montré que le comportement des pigments biliaires est analogue à celui des porphyrines, nous avons finalement procédé à l'examen des bilirubinoïdes des coquilles de *Turbo* et d'*Haliotis*.

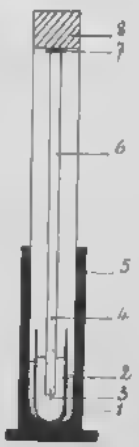


FIG. 32. — 1. Lutidine saturée d'eau ; 2. Eau saturée de lutidine ; 3. Lest ; 4. Emplacement de la tache colorée ; 5. Support du tube à essais ; 6. Bande de papier ; 7. Bande adhésive ; 8. Bouchon de liège.

Comme les auteurs précédents, nous employons le système lutidine-eau, mais en utilisant la chromatographie ascendante et un dispositif simplifié (fig. 32).

Dans un tube à essais (hauteur : 240 mm., diamètre : 24 mm.) contenant 2 cm³ d'eau saturée de lutidine et 2 gouttes d'ammoniaque est introduit un second tube (hauteur : 60 mm., diamètre : 17 mm.), renfermant 6 cm³ de lutidine saturée d'eau. Le pigment, dissous dans de l'ammoniaque approximativement 10 N, est prélevé à l'aide d'une pipette très fine et déposé à environ 60 mm. de l'extrémité inférieure d'une bande de papier Whatman n° 1 (longueur 230 mm., largeur 9 mm.) en une tache de 3 mm. de diamètre. Cette bande de papier, lestée à l'aide de deux attaches métalliques à sa partie inférieure, est fixée par son extrémité supérieure au bouchon de liège

Source : MNHN, Paris

à l'aide d'une bande adhésive. Elle est introduite dans le tube à essais de telle sorte qu'elle plonge dans la lutidine saturée d'eau sans toucher aux parois du petit tube ; puis le bouchon est enfoncé soigneusement. Au bout de quatre heures environ, la bande de papier est sortie du tube à essais, séchée et examinée.

Ce dispositif, employé en série (six tubes par exemple), permet de travailler rapidement et de ne manipuler que de faibles quantités de lutidine (mélange de 2-4 et de 2-5 diméthylpyridine). Signalons que L. B. Rockland et M. S. Dunn (**127**) ont préconisé pour l'étude des acides aminés un système encore plus simple, puisqu'il consiste en un seul tube à essais renfermant du phénol saturé d'eau, l'extrémité supérieure du papier étant assujettie entre le bouchon et les parois du tube.

Les valeurs de Rf des diverses porphyrines étudiées sont comparables à celles données par R. E. H. Nicholas et A. Comfort (**80**) ; elles sont consignées dans le tableau suivant :

Porphyrines	Nb de groupes carboxyliques	Valeurs de Rf
Mésoporphyrine IX.	2	0,74
Hématoporphyrine IX	2	0,73
Deutéroporphyrine IX	2	0,70
Protoporphyrine IX	2	0,69
Uroporphyrine I	8	0,05

Les valeurs de Rf trouvées pour les porphyrines à deux groupes carboxyliques sont voisines, mais cependant différentes ; contrairement aux constatations de R. E. H. Nicholas et A. Comfort, nous n'avons obtenu qu'une seule tache colorée pour l'uroporphyrine I.

Nous avons observé pour les pigments biliaires, ayant deux groupes carboxyliques, des Rf semblables à ceux des porphyrines possédant deux fonctions acides. Les emplacements sur une même bande de papier des taches colorées de la bilirubine (Rf = 0,75) et de la biliverdine (Rf = 0,70) sont nettement distincts.

Pour étudier la turboglaucobiline, l'haliotivioline et l'ensemble des pigments d'*Haliotis cracherodii*, nous avons saponifié leurs esters méthyliques à l'aide d'une solution alcoolique de potasse à 0,5 % (15 minutes à 60°). Etendue d'eau puis acidifiée par quelques gouttes d'acide acétique, la solution alcoolique est agitée avec du talc qui adsorbe les pigments. Après centrifugation ou essorage, ce dernier est lavé avec de l'eau, puis avec une solution légèrement ammoniacale. Les biochromes étant élués avec de l'alcool ammoniacal, la solution colorée obtenue est évaporée sous vide et le résidu repris par 1 goutte d'ammoniaque.

Les valeurs de Rf obtenues avec la turboglaucobiline (0,45), l'haliotivioline (0,50) et l'ensemble des pigments d'*Haliotis cracherodii* (0,51) sont comparables à celle donnée par R. E. H. Nicholas et A. Comfort pour le

Source MNHN, Paris

Rf de la coproporphyrine (0,5). Ces résultats non seulement confirment la présence de quatre groupes carboxyliques dans la turboglaucobiline, mais encore indiquent l'existence de quatre fonctions acides dans l'haliotivioline et dans les autres pigments d'*Haliotis cracherodii*.

L'ensemble des résultats obtenus avec les porphyrines et les pigments biliaires est schématisé dans la figure 33.

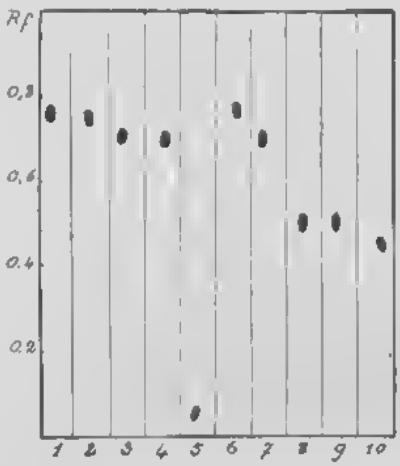


FIG. 33. — 1 : mésoporphyrine IX ; 2 : hématoporphyrine IX ; 3 : deutéroporphyrine IX ; 4 : protoporphyrine IX ; 5 : uroporphyrine I ; 6 : bilirubine ; 7 : biliverdine ; 8 : haliotivioline ; 9 : pigments d'*Haliotis* ; 10 : turboglaucobiline.

d) *CONCLUSIONS*

En dehors du pigment principal rouge violet, auquel nous avons donné le nom d'haliotivioline, l'analyse chromatographique sur alumine permet de séparer trois autres fractions colorées : l'une jaune orange, l'autre verte et la dernière violette. Ces divers biochromes sont étroitement liés les uns aux autres et constituent une nouvelle série de pigments biliaires. C'est ainsi que la réduction de l'haliotivioline à l'aide d'hydrosulfite de sodium conduit à un pigment jaune orange, dont les propriétés sont entièrement comparables à celles du biochrome naturel jaune orange. L'analyse chromatographique du mélange de ces deux bilirubinoïdes permet de conclure à leur identité. De même, un pigment jaune orange, semblable aux précédents, est obtenu par réduction du biochrome vert à l'aide d'hydrosulfite de sodium. Enfin le pigment violet présente des propriétés analogues à celles de l'haliotivioline et seule l'analyse chromatographique permet de distinguer ces deux biochromes, problablement isomères. En outre une étude préliminaire montre l'existence d'une certaine parenté entre les pigments d'*H. rufescens* et d'*H. cracherodii*.

Source MNHN, Paris

Par l'ensemble de ses propriétés, le biochrome vert s'apparente aux bilirubinoïdes du groupe des verdines (bila-triènes) ; le pigment jaune orange entre dans la classe des rubines (bila-diènes (a, c)) ; enfin les pigments violets présentent les propriétés des violines (bila-diènes a, b)) (voir page 64). Ces bilirubinoïdes se distinguent cependant des autres pigments biliaires naturels par certaines particularités.

C'est ainsi que l'une des caractéristiques du pigment jaune orangé réside dans le changement de teinte et les modifications spectroscopiques présentées par ses solutions suivant la polarité du solvant. Des constatations analogues ont été signalées chez les carotènoïdes, possédant une fonction cétone en conjugaison avec une chaîne latérale ayant plusieurs doubles liaisons (rhodoxanthine) (**125**). Il est ainsi permis de penser à l'existence d'une fonction cétonique dans le pigment jaune orange, qui, comme tous les bilirubinoïdes, possède un grand nombre de doubles liaisons. Des spectres analogues sont présentés par le pigment jaune orangé d'*H. rufescens*.

Une autre particularité des pigments d'*H. cracherodii* est l'absence de fluorescence de leurs sels de zinc. A notre connaissance, aucune constatation de cet ordre n'a encore été signalée chez les pigments biliaires naturels. Parmi ceux-ci, les uns ont des complexes zinciques à fluorescence verte (urobiline) ou rouge (mésobilivioline), les autres (bilirubine ou biliverdine), dont les sels de zinc ne sont pas fluorescents, peuvent être oxydés en bilirubinoïdes à complexe fluorescent (réaction iode-zincique). A des fluorescences semblables correspondent des structures chimiques analogues avec une distribution identique des doubles liaisons. C'est ainsi que les mésobiliviolines et les mésobilipurpurines ont une structure bila-diène (a, b) ; la seule différence entre ces pigments réside dans la saturation de l'un des ponts carbonés par deux atomes d'hydrogène dans les premiers, par un oxygène dans les seconds. Il est évident que toute modification dans la structure chimique, qui entraînerait la disparition de la fluorescence chez les mésobiliviolines, la supprimerait également chez les mésobilipurpurines. L'absence de fluorescence des sels de zinc de l'haliotivioline, d'une part, et des produits d'oxydation des pigments jaune orangé et vert, d'autre part, ne peut qu'être due à une cause identique, qui doit être recherchée dans une modification de la constitution chimique de ces biochromes par rapport à celle des autres bilirubinoïdes naturels.

Cette modification est légère, car il est possible, en partant de l'haliotivioline, de passer à une *nouvelle série de bilirubinoïdes à sels de zinc fluorescents*. Il suffit en effet de réduire l'haliotivioline à l'aide de poudre de zinc en milieu acétique, puis de laisser la liqueur se réoxyder à l'air pour obtenir une solution fluorescente. L'analyse chromatographique permet de séparer un pigment rouge orangé, dont le sel de zinc possède une fluorescence verte, et un biochrome violet, dont le complexe zincique présente une fluorescence rouge ; le premier de ces produits s'apparente à l'urobiline, le second à la mésobilivioline. L'analogie des spectres d'absorption du biochrome violet

Source : MNHN, Paris

fluorescent et de l'haliotivioline montre que la réduction zincique n'apporte qu'une légère modification dans la constitution chimique de l'haliotivioline.

Les relations existant entre la constitution chimique des pigments biliaires et leur possibilité de donner des complexes fluorescents n'ont fait l'objet d'aucune étude particulière. Cependant H. Fischer (**124**) a remarqué que les esters méthyliques des bilirubines ou des biliverdines dont l'un des groupements hydroxyles en position 1' ou 8' est remplacé par un radical méthoxyle (voir page 88), donnent par oxydation des produits dont les sels de zinc ne sont pas fluorescents. De même cet auteur a fait la synthèse d'une bilirubine (voir page 89) dont le carbone du pont b est lié à un noyau benzénique (**124**) ; après addition d'acétate de zinc et d'iode, la solution alcoolique de ce pigment présente le spectre des sels complexes des bilipurpurines, mais aucune fluorescence n'apparaît. Dans les deux cas, le remplacement d'un hydrogène, soit dans un des groupements hydroxyles, soit dans un pont carboné, par une liaison avec un atome de carbone détermine la disparition de la fluorescence des sels de zinc. Dans le cas des pigments d'*Haliotis* il est permis de penser que l'absence de fluorescence est due à une cause analogue et que la réduction zincique ou bien restaure un groupe —OH en position 1' ou 8', ou bien restitue un hydrogène à un pont carboné.

Bien que nous n'ayons pu obtenir l'haliotividine à l'état cristallisé, nous pensons l'avoir isolée à l'état pur, grâce à l'analyse chromatographique et à des précipitations successives. Rappelons que certains pigments biliaires, tels que la bilifuscine et la mésobilifuscine, n'ont pu être ni isolés, ni synthétisés à l'état cristallisé. La nature tétrapyrrolique du pigment principal d'*H. cracherodii* a été mise en doute par divers auteurs (**118**) (**122**), qui lui ont attribué une structure indigotique. Cependant, ayant pris connaissance des résultats que nous avions obtenus, A. Comfort vient de reconnaître la nature tétrapyrrolique du pigment principal d'*H. cracherodii* (**123**).

Il nous semble qu'aucune contestation ne puisse dorénavant subsister sur la parenté de l'haliotividine avec les pigments biliaires. En effet la structure tétrapyrrolique de ce biochrome est confirmée par son analyse élémentaire, par la détermination de son poids moléculaire, par sa réduction soit en pigment donnant la réaction de Gmelin, soit en bilirubinoïdes dont les complexes zinciques sont fluorescents.

Les formules pouvant être attribuées à l'haliotividine (voir page 94) sont voisines de celle d'une copromésobilivioline ($C_{39}H_{48}O_{10}N_4$) (voir pages 94 et 95), dont elles se distinguent principalement par la présence de deux atomes d'oxygène supplémentaires. La teneur en groupements méthoxyle s'accorde avec la présence de trois fonctions carboxyle ; toutefois nous pensons que ce dosage, effectué sur 1 mg. 9 de pigment, manque d'exactitude et nous accordons plus de crédit à la chromatographie sur papier qui indique l'existence de quatre fonctions acides. L'analyse élémentaire de l'haliotivioline donne des résultats extrêmement voisins de ceux trouvés pour la turboglaucobiline. Ces deux pigments possèdent 12 ou 13 atomes

Source : MNHN, Paris

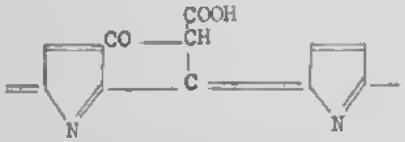
d'oxygène dans leur molécule et leur constitution chimique est probablement très voisine, quoique différente. En effet, la turboglaucobiline présente toutes les propriétés des verdines, alors que l'haliotivioline se distingue nettement des autres violines par l'absence de fluorescence du complexe zincique.

Envisageant la constitution chimique de la turboglaucobiline, nous avons émis l'hypothèse de la présence de groupements propanoïques, renfermant des fonctions alcool secondaire : tels que —CH_2—CHOH—COOH ou—CHOH—CH_2—COOH. Cette hypothèse est également valable pour l'haliotivioline et par conséquent pour le pigment jaune orange. Toutefois les modifications de spectres, observées avec ce dernier biochrome, sont plutôt en faveur de l'existence d'une fonction cétonique dans les chaînes latérales des bilirubinoïdes d'*H. cracherodii*. Rappelons que le maximum d'absorption de la mésobilirubine se situe à λ 425 m_μ et celui de la bilirubine à λ 450 m_μ (**19**), le déplacement de la courbe d'absorption de ce dernier pigment vers les grandes longueurs d'ondes étant dû à la présence de doubles liaisons (groupements vinyle) dans les chaînes latérales. Le déplacement des bandes d'absorption du pigment jaune orange vers la partie rouge du spectre, lorsque le solvant est polaire, s'expliquerait ainsi par l'apparition de doubles liaisons dues à l'énolisation de fonctions cétoniques :

$$—CO—CH_2—COOH \rightleftarrows —C(OH)=CH—COOH.$$

Il est cependant curieux que nous n'ayons pu observer de modifications spectroscopiques aussi nettes avec les autres pigments d'*H. cracherodii*. Dans le cas de l'haliotivioline il faut noter toutefois l'apparition d'une troisième bande d'absorption dans l'ultra-violet lorsque le solvant est polaire et de légers changements dans les teintes des solutions chloroformique et alcoolique. Signalons par ailleurs un décalage important vers l'extrême rouge des bandes d'absorption des pigments verts d'*H. cracherodii* et d'*H. rufescens* par rapport à celles de la biliverdine, aussi bien dans l'ultra-violet que dans le visible.

L'hypothèse la plus plausible pour expliquer l'absence de fluorescence du complexe zincique de l'haliotivioline est celle d'une liaison entre l'un des ponts carbonés et l'une des chaînes latérales. Par analogie avec les chlorophylles, il est possible de penser à une constitution correspondant au schéma suivant :



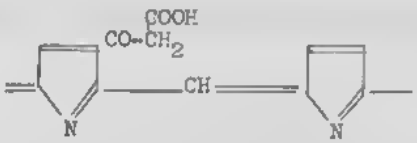
Une telle constitution permet d'expliquer :

— l'absence de fluorescence des sels de zinc des pigments d'*H. cracherodii*

Source MNHN, Paris

par suite du remplacement de l'hydrogène du pont carboné par une liaison entre deux atomes de carbone ;

— le passage, par réduction zincique de l'haliotivioline, puis réoxydation à des pigments biliaires dont les sels de zinc sont fluorescents, la chaîne latérale devenant libre et le pont carboné retrouvant un atome d'hydrogène ;



— les différences de comportement des sels de zinc de l'haliotivioline et de la turboglaucobiline, malgré des formules élémentaires voisines ;

— les analogies de spectres entre l'haliotivioline et le pigment violet à fluorescence rouge, obtenu par réduction zincique et réoxydation, les différences entre ces deux pigments ne portant que sur la disparition de la liaison entre le pont carboné et la chaîne latérale.

En réalité, nous devons constater qu'il serait vain, dans l'état actuel de nos connaissances, de vouloir donner une formule de l'haliotivioline, les hypothèses envisagées ne pouvant servir qu'à orienter un travail ultérieur. Pour établir la constitution des pigments d'*Haliotis*, il faudrait pouvoir en étudier les produits de transformation et de dégradation. Malheureusement, l'un des obstacles à l'étude de ces biochromes réside dans la difficulté d'obtenir des quantités suffisantes de produit pour en entreprendre une étude chimique plus poussée.

Source MNHN, Paris

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DES PORPHYRINES DE L'AMBRE GRIS

A. — HISTORIQUE

L'ambre gris est une concrétion intestinale du Cachalot (*Physeter macrocephalus*). Il se présente sous forme d'amas foncés presque noirs, de taille variable et d'odeur caractéristique. Le processus de formation de l'ambre gris est encore très mal connu. Une revue récente de la chimie de l'ambre gris est donnée par E. Lederer (**128**)

La présence, dans l'ambre gris, d'un pigment apparenté aux porphyrines est signalée par M. Suzuki (**129**), en 1925. Quelques années plus tard, Y. Okahara (**130**) donne à la porphyrine le nom d'ambroporphyrine. Après avoir extrait la porphyrine par de l'acide chlorhydrique et l'avoir purifiée par des dissolutions successives suivies de précipitations par l'eau, l'auteur obtient une poudre brun rouge amorphe soluble dans l'éther, l'alcool, le chloroforme, les acides dilués et les alcalis, insoluble dans l'eau et l'éther de pétrole. Si le spectre de ce pigment en solution éthérée est comparable à celui de la coproporphyrine, il se montre différent en milieu alcalin. Par estérification de la porphyrine libre à l'aide d'alcool méthylique chlorhydrique, Y. Okahara obtient un produit cristallisé en aiguilles brun rouge, réunies en houppes. Dans son livre « Die Chemie des Pyrrols » (1937) (**131**), H. Fischer consacre un paragraphe spécial à l'ambroporphyrine, qu'il semble considérer comme une nouvelle porphyrine.

B. — RECHERCHES PERSONNELLES

La matière première utilisée est la fraction de l'ambre gris insoluble dans l'éther ; elle représente environ 15 % du poids de l'ambre. Au cours d'une étude préliminaire sur 20 g. de résidu d'ambre gris, nous avons isolé par chromatographie 8 mg. d'une porphyrine que nous avons identifiée avec la protoporphyrine IX. Puis, dans une nouvelle série d'essais, à partir de 150 g. de résidu d'ambre, nous avons séparé par chromatographie 30 mg. de protoporphyrine et 10 mg. d'une autre porphyrine identique à la mésoporphyrine IX. Les deux séries de recherches ayant été conduites différemment, nous pensons qu'il est utile de les exposer séparément.

Source : MNHN, Paris

a) *ESSAIS PRÉLIMINAIRES*

1° Extraction et estérification.

20 g. de résidu d'ambre sont traités par 100 cm³ environ d'alcool méthylique chlorhydrique à 12 % à l'ébullition pendant 5 minutes. La solution brun foncé, séparée du résidu par filtration sur Büchner, présente en lumière ultra-violette une intense fluorescence rouge. Elle est additionnée de 200 cm³ de chloroforme, puis d'eau distillée ; le chloroforme se sépare en une couche brunâtre à fluorescence rouge intense, alors que la couche aqueuse, également brunâtre, présente une fluorescence verdâtre. La solution chloroformique est décantée, lavée trois fois à l'eau distillée, deux fois avec une solution de carbonate de sodium à 5 % et de nouveau trois fois à l'eau distillée. Finalement, la solution chloroformique est déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre.

Après filtration, la solution chloroformique est évaporée à sec et le résidu brunâtre est repris plusieurs fois par de l'éther à l'ébullition jusqu'à concurrence de 100 cm³. La solution éthérée rouge présente une intense fluorescence rouge en lumière ultra-violette. Après concentration à 10 cm³ environ, elle est abandonnée pendant une nuit à la température du laboratoire. Le produit cristallisé, recueilli par centrifugation, est lavé avec quelques cm³ d'éther, puis recristallisé dans un mélange de chloroforme et d'alcool méthylique bouillant. Les cristaux obtenus sont caractéristiques de l'ester méthylique de la protoporphyrine (PF : 224°-225°).

2° Purification par chromatographie

Le produit cristallisé est dissous dans la plus petite quantité possible de chloroforme, puis la solution est additionnée de 25 cm³ de benzène et de 25 cm³ d'éther de pétrole. Le mélange est filtré sur une colonne d'alumine qui fixe les pigments dans sa portion supérieure. Le chromatogramme est développé à l'aide d'un mélange d'un volume de chloroforme pour 4 volumes d'éther de pétrole. Une zone rose se forme et descend le long de la colonne d'alumine. Cette zone principale est précédée d'une mince zone violacée. Lorsque la zone principale atteint le bas de la colonne, le liquide coloré, qui filtre, est recueilli.

Par évaporation de cette solution, la porphyrine cristallise au sein du solvant sous forme de losanges arrondis aux angles. Ces cristaux sont recueillis par centrifugation, puis desséchés sous vide. Nous obtenons ainsi 8 mg. de pigment cristallisé.

3° Identification.

Les divers aspects cristallins de la porphyrine ainsi isolée sont comparables à ceux de l'ester méthylique de la protoporphyrine observés dans des conditions identiques de cristallisation. Son point de fusion est de 224°-227°.

Source : MNHN, Paris

Le mélange de ce pigment et de l'ester méthylique de la protoporphyrine ne montre aucun abaissement du point de fusion (224°-225°).

Le spectre d'absorption dans le visible de la solution chloroformique est superposable à celui de l'ester méthylique de la protoporphyrine : I λ 630 $m\mu$; II λ 575 $m\mu$; III λ 539 $m\mu$; IV λ 504 $m\mu$.

Enfin, la chromatographie sur alumine d'un mélange de ce pigment et de l'ester méthylique de la protoporphyrine ne donne qu'une seule zone colorée.

b) *ESSAIS DÉFINITIFS*

1° Extraction et estérification.

150 g. de résidu d'ambre gris (correspondant à environ 1 kg. d'ambre) sont traités par 1 litre d'alcool méthylique chlorhydrique à 10 %. Le solvant acide restant plusieurs jours en contact avec l'ambre gris à l'obscurité, les porphyrines sont dissoutes et estérifiées. La solution alcoolique brun rouge, séparée de la fraction insoluble par filtration sur Büchner, présente une intense fluorescence rouge en lumière ultra-violette. La fraction insoluble reprise par de l'alcool méthylique chlorhydrique donne une nouvelle solution brunâtre, mais celle-ci, exposée aux rayons ultra-violets, ne présente plus de fluorescence rouge, mais une fluorescence verdâtre.

Après distillation à sec sous vide de l'extrait alcoolique initial à fluorescence rouge, le résidu est repris par du chloroforme qui dissout les porphyrines. La solution chloroformique brun rouge est d'abord lavée à l'eau distillée, puis deux fois avec une solution de carbonate de sodium à 5 %, enfin de nouveau à l'eau distillée. Après filtration, la solution chloroformique est déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre.

2° Séparation des pigments par chromatographie.

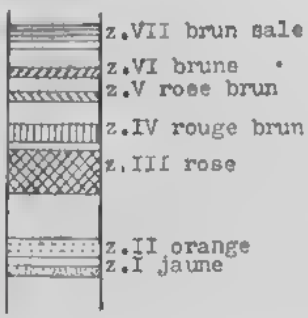


FIG. 34.

Après concentration à environ 90 cm³, la liqueur chloroformique est additionnée d'un égal volume d'éther de pétrole, puis le mélange est versé sur une colonne d'alumine (150 g.). Lorsque la solution colorée est adsorbée, nous continuons d'humecter la colonne d'alumine avec un mélange à volumes égaux de chloroforme et d'éther de pétrole.

Le chromatogramme obtenu montre toute une série de zones colorées (fig. 34). Les zones principales, superposées (III et IV), présentent une intense fluorescence rouge en lumière ultra-violette. Les diverses zones colorées sont sorties du tube à chromatographier et sont éluées séparément à l'aide de chloroforme.

Source MNHN, Paris

a) *Purification de la porphyrine de la zone III.*

Le produit d'évaporation de l'éluat de la zone III est un mélange de la porphyrine et d'une substance incolore cristallisée. Pour séparer ces deux constituants, le produit d'évaporation est repris par un peu de chloroforme, puis la solution est diluée avec de l'éther. La porphyrine est ensuite extraite de la solution éthérée à plusieurs reprises avec de l'acide chlorhydrique à 27 %. Après neutralisation des solutions acides par addition d'acétate de sodium jusqu'à virage de la teinte violette au rouge, la porphyrine est extraite par du chloroforme. La solution chloroformique est ensuite lavée suivant la technique habituelle avec une liqueur alcaline, puis déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre.

La porphyrine de la zone III est finalement purifiée par une nouvelle chromatographie sur alumine. Après concentration à environ 15 cm³, la solution chloroformique est additionnée de 3 fois son volume d'éther de pétrole et le mélange est filtré sur une colonne d'alumine (30 g.) ; le chromatogramme est ensuite développé à l'aide d'un mélange composé d'un volume de chloroforme pour 3 volumes d'éther de pétrole. Une zone principale, correspondant au pigment de la zone III, descend le long de la colonne d'alumine, suivie d'une zone rose pâle (porphyrine de la zone IV).

La zone principale étant sortie du tube à chromatographier, la porphyrine est éluée avec du chloroforme. Finalement, la solution chloroformique, après concentration à quelques cm³, est additionnée d'alcool méthylique bouillant. Par refroidissement, la porphyrine cristallise sous forme de petites tablettes. Nous obtenons ainsi environ 10 mg. de porphyrine cristallisée.

b) *Purification de la porphyrine de la zone IV.*

La porphyrine de la zone IV est également extraite de sa solution éthérée par de l'acide chlorhydrique à 27 %. Après neutralisation avec de l'acétate de sodium, la porphyrine est extraite au chloroforme, puis la solution chloroformique est lavée avec une solution de carbonate de sodium à 5 % et déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre.

Après concentration à environ 10 cm³, la solution chloroformique est additionnée de 3 fois son volume d'éther de pétrole, puis le mélange est versé sur une colonne d'alumine (30 g.). Le chromatogramme est ensuite développé avec un mélange d'un volume de chloroforme pour 3 volumes d'éther de pétrole. Une zone principale descend le long de la colonne d'alumine, précédée d'une zone rose, correspondant à un peu de porphyrine de la zone III.

L'éluat chloroformique du pigment de la zone principale, après concentration à quelques cm³, est additionné d'alcool méthylique bouillant. Par refroidissement, la porphyrine cristallise. Nous obtenons ainsi environ 30 mg. de produit cristallisé.

Source MNHN, Paris

3° Identification des porphyrines isolées.

a) *Propriétés de la porphyrine de la zone III.*

L'aspect cristallin de la porphyrine de la zone III est identique à celui de l'ester méthylique de la mésoporphyrine IX. Son point de fusion est de 210°-214°. Le mélange de cette porphyrine et de l'ester méthylique de la mésoporphyrine ne montre aucun abaissement du point de fusion (210°-214°).

Cette porphyrine est très soluble dans le chloroforme, peu soluble dans l'éther et l'alcool méthylique, insoluble dans l'éther de pétrole.

Les analyses élémentaires des porphyrines de l'ambre gris ont été effectuées au Laboratoire de Chimie du Muséum de Paris. L'analyse élémentaire de la porphyrine de la zone III s'accorde avec la formule $C_{36}H_{42}O_4N_4$ qui est celle de l'ester méthylique de la mésoporphyrine.

Les résultats, fournis par deux microdosages C, H, sont les suivants :

Prise d'essai en mg.	H_2O en mg.	CO_2 en mg.
3,680	2,355	9,815
3,514	2,350	9,275

	C %	H %
calculé	72,69	7,11
trouvé	72,78	7,16
	72,02	7,48

La courbe d'absorption dans le visible de la solution chloroformique, déterminée à l'aide du spectrophotomètre d'Yvon et Jobin, présente les 5 bandes d'absorption (I, Ia, II, III, IV) caractéristiques des porphyrines dérivant des étioporphyrines. La bande Ia, très faible, n'est visible qu'avec une solution suffisamment concentrée ; l'intensité de l'absorption des autres bandes croît de I à IV. Les positions des maxima sont : I λ 623 $m\mu$; Ia λ 595 $m\mu$; II λ 567 $m\mu$; III λ 532 $m\mu$; IV λ 499 $m\mu$. Le spectre d'absorption de l'ester méthylique de la mésoporphyrine en solution chloroformique est identique, les positions des maxima des bandes sont comparables : I λ 623 $m\mu$; Ia λ 595 $m\mu$; II λ 568 $m\mu$; III λ 532 $m\mu$; IV λ 499 $m\mu$.

L'identité du pigment de la zone III avec la mésoporphyrine IX est également établie par une chromatographie mixte. Pour cela une solution chloroformique des deux pigments est additionnée de 3 fois son volume d'éther de pétrole, puis le mélange est versé sur une colonne d'alumine. Lorsque la solution pigmentée est adsorbée, la colonne est humectée avec un mélange d'un volume de chloroforme pour 3 volumes d'éther de pétrole. Une seule zone rouge se forme et descend le long de la colonne d'alumine.

Il apparaît ainsi que la porphyrine correspondant à la zone III est identique à l'ester méthylique de la mésoporphyrine IX (voir page 56).

Source MNHN, Paris

b) *Propriétés de la porphyrine de la zone IV.*

L'aspect cristallin de la porphyrine de la zone IV est identique à celui de l'ester méthylique de la protoporphyrine IX. Son point de fusion est de 224°-225°. Le mélange de ce pigment et de l'ester méthylique de la protoporphyrine ne montre aucun abaissement du point de fusion (224°-225°).

Cette porphyrine est très soluble dans le chloroforme, peu soluble dans l'alcool méthylique et l'éther à froid, insoluble dans l'éther de pétrole.

L'analyse élémentaire s'accorde avec celle de l'ester méthylique de la protoporphyrine : $C_{36}H_{38}O_4N_4$. Le microdosage C, H, donne en effet les résultats suivants :

Prise d'essai en mg.	H_2O en mg.	CO_2 en mg.
3,755	2,190	10,005

	C %	H %
calculé	73,19	6,52
trouvé	72,71	6,49

Le spectre d'absorption de cette porphyrine, en solution chloroformique, présente les 5 bandes (I, Ia, II, III, IV) des porphyrines dérivant des étioporphyrines. La bande Ia, très faible, n'est visible qu'avec une solution suffisamment concentrée ; l'intensité de l'absorption des autres bandes croît de I à IV. Les positions des maxima sont respectivement : I λ 630 mμ ; Ia λ 602 mμ ; II λ 575 mμ ; III λ 539 mμ ; IV λ 504 mμ. La courbe d'absorption de l'ester méthylique de la protoporphyrine en solution chloroformique est identique et les positions des maxima sont comparables : I λ 630 mμ ; Ia λ 602 mμ ; II λ 575 mμ ; III λ 540 mμ ; IV λ 504 mμ.

Une chromatographie mixte de cette porphyrine et de l'ester méthylique de la protoporphyrine, effectuée sur alumine et dans les mêmes conditions que pour le pigment de la zone III, ne donne qu'une seule zone colorée.

Il apparaît ainsi que la porphyrine de la zone IV est identique à l'ester méthylique de la protoporphyrine IX (voir page 55).

c) *CONCLUSION*

Le pigment dénommé ambraporphyrine par Y. Okahara (**130**) et considéré par H. Fischer (**131**) comme une nouvelle porphyrine est, en réalité, un mélange de protoporphyrine IX et de mésoporphyrine IX. Ces deux biocheomes, extraits à l'état d'esters méthyliques, ont pu être séparés par chromatographie sur alumine. Bien qu'ayant une constitution chimique extrêmement voisine, la protoporphyrine, qui possède deux groupes vinyle à la place des deux radicaux éthyle de la mésoporphyrine, est plus fortement adsorbée. Ces deux pigments ont été caractérisés par leur point de fusion, leur analyse élémentaire et leur spectre d'absorption dans le visible. Leur étude a été poursuivie conjointement avec celle des esters méthyliques d'une

Source MNHN, Paris

protoporphyrine et d'une mésoporphyrine préparées à partir de l'hémine. Ils ont pu ainsi être identifiés respectivement par chromatographie mixte.

A 1 kg. d'ambre gris correspond environ 30 mg. de protoporphyrine et 10 mg. de mésoporphyrine.

Signalons que la protoporphyrine IX se trouve en petite quantité dans les fèces de l'homme et qu'elle a été signalée dans l'intestin, en particulier lors d'hémorragie et d'ingestion de sang (**131**). Par ailleurs, l'hémoglobine et le sang, attaqués par les bactéries intestinales, donnent de la protoporphyrine. De même la mésoporphyrine a été isolée des fèces de malades du foie et d'un cas de porphyrie (**132**) (**76**).

La présence de porphyrines dans l'ambre gris pourrait s'expliquer de la façon suivante : les becs de Seiche, avalés par les Cachalots et retrouvés dans l'ambre gris, provoquent des hémorragies dans l'intestin de ces Cétacés ; l'hémoglobine est transformée par les bactéries en protoporphyrine dont une partie est ensuite réduite en mésoporphyrine. Ainsi que nous l'avons signalé antérieurement, la réduction des radicaux vinyliques de la protoporphyrine en groupes éthyle conduit à la mésoporphyrine. Cette réduction des radicaux vinyle des pigments tétrapyrroliques par les bactéries intestinales a surtout été étudiée dans le cas des bilirubinoïdes (**133**, **134**, **135**). Il semble ainsi que la formation de l'ambre gris est due à un processus pathologique.

Source MNHN, Paris

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les techniques employées pour l'extraction, la purification et la caractérisation des pigments tétrapyrroliques étudiés au cours de ce travail sont indiquées dans un chapitre préliminaire. Dans les divers cas les pigments sont, en effet, extraits et estérifiés à l'aide d'alcool méthylique chlorhydrique, puis purifiés par chromatographie sur alumine et cristallisés dans des mélanges de solvants ; l'analyse élémentaire en est ensuite effectuée et les propriétés étudiées.

Dans la *première partie* de cet exposé, nous examinons les porphyrines, puis les pigments biliaires des coquilles de Mollusques.

L'emploi de l'analyse chromatographique nous a permis d'isoler et de caractériser les *porphyrines* des coquilles de divers Mollusques appartenant soit à la famille des Ptéridés (*Pteria macroptera*, *P. margaritifera*), soit à celle des Trochidés (*Clanculus pharaonis*, *Trochus virgatus* et *T. maculatus*).

A partir de deux coquilles de *Pteria macroptera* sont obtenus 22 mg. de porphyrine cristallisée. Par son aspect cristallin, son analyse élémentaire, ses spectres et ses solubilités, cette porphyrine s'apparente aux uroporphyrines ; par son point de fusion et par celui de son sel complexe de cuivre, elle s'identifie avec l'ester méthylique de l'uroporphyrine I. Au cours de la chromatographie, la présence d'uroporphyrine III n'est pas révélée.

Les coquilles de *Pteria margaritifera* ne renferment que des traces d'une porphyrine dont le comportement chromatographique et le spectre d'absorption sont comparables à ceux de l'ester méthylique de l'uroporphyrine I. De même les porphyrines isolées des coquilles de *Clanculus pharaonis*, de *Trochus virgatus* et de *T. maculatus* ont un comportement chromatographique analogue et des spectres identiques à ceux de l'uroporphyrine de *Pteria macroptera*.

Ces résultats, joints à ceux obtenus par H. Fischer (**99**, **66**) et par A. Comfort (**107**), montrent que la présence d'uroporphyrine dans les coquilles des Ptéridés est un fait général ; chez certaines espèces (*P. macroptera*, *P. vulgaris*, *P. radiata*), cette uroporphyrine se rencontre en quantité relativement importante, chez d'autres elle ne se trouve qu'à l'état de traces (*P. margaritifera*). L'existence d'uroporphyrine I dans les coquilles de la famille des Trochidés n'avait pas encore été signalée ; certaines espèces de *Trochus* renferment un pigment vert présentant les caractères d'une biliverdine ; faute de matière première, nous n'avons pu étudier ce bilirubi-

Source MNHN, Paris

noïde qu'il aurait été cependant intéressant de comparer à celui du test de *Turbo*.

Nous avons examiné ensuite les *pigments biliaires* des coquilles de Mollusques de la famille des Turbinidés (*Turbo Regenfussi*, *T. marmoratus*, *T. elegans*) et des Haliotidés (*Haliotis cracherodii*).

A partir de 30 coquilles de *Turbo Regenfussi* nous isolons 20 mg. d'un pigment bleu que nous proposons de dénommer *turboglaucobiline*. Extrait sous forme d'ester méthylique, puis purifié par chromatographie sur alumine, ce pigment est obtenu à l'état cristallisé (PF 205°-206°). Il présente toutes les propriétés des pigments biliaires, possédant, comme la biliverdine, une structure bila-triène (couleurs et spectres des solutions, test de Gmelin et réaction iodozincique). Cependant les maxima des bandes d'absorption de la turboglaucobiline dans l'ultra-violet et dans le visible ont des positions intermédiaires entre ceux de la glaucobiline et de la coproglaucobiline d'une part et de la biliverdine d'autre part.

C'est le premier pigment biliaire de Mollusques obtenu à l'état cristallisé. L'analyse élémentaire s'accorde avec les formules $C_{38}H_{44}O_{12}N_4$, $C_{39}H_{46}O_{12}N_4$ et $C_{39}H_{46}O_{13}N_4$. Nous pensons que les formules en C_{39}, qui font de ce biochrome soit une dioxy- soit une trioxycoproglaucobiline, sont les plus vraisemblables. Les deux ou trois atomes d'oxygène supplémentaires ne peuvent être contenus que dans les chaînes latérales fixées sur les noyaux pyrroliques en position β. En effet, toute substitution en position α entraînerait une modification de la structure bila-triène et un changement des propriétés générales du pigment. D'après la teneur en groupements méthoxyle, confirmée par l'analyse chromatographique sur papier, la turboglaucobiline possède quatre fonctions acides comme une coproglaucobiline. L'analyse élémentaire de l'*haliotivioline*, pigment principal des coquilles d'*Haliotis cracherodii*, donne des résultats comparables à ceux obtenus avec la turboglaucobiline. Tous les pigments biliaires naturels connus jusqu'à ce jour dérivaient de la protoporphyrine ; c'est la première fois que des bilirubinoïdes, ayant une composition voisine d'une coproglaucobiline, sont signalés dans le règne animal.

Nous exposons les raisons qui nous font envisager l'existence de groupements oxypropanoïques : —CHOH—CH_2—COOH ou —CH_2—CHOH—COOH dans la turboglaucobiline, pour laquelle nous proposons une formule développée. Si cette formule était confirmée, il faudrait considérer les chaînes oxypropanoïques de la turboglaucobiline soit comme des formes de passage entre les radicaux propanoïques et vinyliques, soit comme des groupements précurseurs de ces radicaux. Toutefois cette formule ne doit être considérée momentanément que comme l'hypothèse de travail la plus probable, la quantité de pigment obtenu n'ayant pas permis d'étudier les produits de dégradation de la turboglaucobiline.

La présence de turboglaucobiline est également mise en évidence dans les coquilles de *Turbo marmoratus* et de *T. elegans*.

Source : MNHN, Paris

L'analyse chromatographique des pigments estérifiés d'*Haliotis cracherodii* permet de séparer un biochrome principal rouge violet, que nous dénommons *haliotivioline*, et diverses fractions colorées : l'une verte, l'autre violette et la dernière jaune orange. Ces divers biochromes, qui constituent *une nouvelle série de pigments biliaires*, sont étroitement liés les uns aux autres. En effet, un pigment jaune orange, identique au biochrome naturel, est obtenu par réduction de l'haliotivioline à l'aide d'hydrosulfite de sodium. De même la réduction du bilirubinoïde vert conduit à un pigment jaune orange analogue aux précédents. Enfin les propriétés du biochrome violet sont comparables à celles de l'haliotivioline et seule l'analyse chromatographique permet de différencier ces deux bilirubinoïdes. En outre, une étude préliminaire montre l'existence d'une certaine parenté entre les pigments d'*Haliotis rufescens* et d'*H. cracherodii*.

Les réactions et les spectres d'absorption dans l'ultra-violet et le visible de ces divers pigments sont étudiés en détail. Par leurs propriétés générales ils s'apparentent aux bilirubinoïdes actuellement connus, mais ils s'en distinguent par diverses particularités. C'est ainsi que par l'ensemble de ses réactions et de ses spectres le *pigment vert* se rattache à la classe des verdines, c'est-à-dire des bilirubinoïdes à structure bila-triène. Il donne en effet la réaction de Gmelin et présente des spectres analogues à ceux de la biliverdine. Cependant, bien que donnant le spectre d'absorption caractéristique de la réaction iodo-zincique, il ne montre aucune fluorescence ; en outre ses solutions neutres présentent un décalage exceptionnel des maxima d'absorption vers les grandes longueurs d'ondes. Le *pigment violet* ainsi que l'haliotivioline présentent les principaux caractères des bilirubinoïdes de la classe des violines (bila-diène (a, b)) ; ils s'en distinguent cependant par leurs maxima d'absorption et par l'absence de fluorescence de leur sel de zinc. Enfin le *pigment jaune orange*, qui donne les phases verte, bleue, violette, rouge et orange de la réaction de Gmelin, appartient à la classe des rubines (bila-diène (a, c)) ; les maxima d'absorption de ses solutions se situent dans la même région du spectre que ceux de la bilirubine. Toutefois, de même que dans le cas du pigment vert, aucune fluorescence n'apparaît au cours de la réaction iodo-zincique. En outre, l'une des particularités du pigment jaune orange réside dans les changements de teintes et les modifications spectroscopiques présentés par ses solutions lorsque la polarité du solvant varie.

Aucune constatation de cet ordre n'avait encore été faite dans la série des pigments biliaires ; par contre, des modifications semblables ont été signalées chez certains caroténoïdes possédant une fonction cétonique en conjugaison avec une chaîne ayant plusieurs doubles liaisons. Les bandes d'absorption des solutions alcooliques neutre, acide ou zincique sont déplacées vers les grandes longueurs d'ondes par rapport à celles des liqueurs chloroformiques. Il semble exister un état d'équilibre entre deux structures chimiques différentes, probablement entre une fonction cétonique et sa forme énolique.

Source : MNHN, Paris

Nous trouvons des spectres analogues pour un pigment jaune orange, isolé des coquilles d'*Haliotis rufescens*.

A partir de 10 coquilles d'*Haliotis cracherodii*, nous obtenons environ 25 mg. d'haliotivioline, sous forme d'un produit amorphe violet foncé. Ayant purifié ce pigment par des chromatographies et par des précipitations successives, nous pensons l'avoir obtenu à l'état pur. Ses solubilités sont comparables à celles des esters méthyliques des pigments biliaires. Les valeurs analytiques trouvées pour deux préparations différentes s'accordent avec les formules : $C_{38}H_{44}O_{12}N_4$, $C_{38}H_{46}O_{12}N_4$, $C_{39}H_{46}O_{12}N_4$ et $C_{39}H_{48}O_{12}N_4$. Ces formules sont voisines de celles de l'ester méthylique d'une copromésobilivioline, dont elles se distinguent cependant par la présence de 12 atomes d'oxygène au lieu de 10 pour une copromésobilivioline. Comme pour la turboglaucobiline, nous pensons que les formules en C_{39} sont les plus probables. Le dosage des groupes méthoxyle indique la présence de trois groupements carboxyliques ; il nous semble toutefois que cette analyse, effectuée sur une très faible quantité de pigment, manque d'exactitude et nous accordons plus de crédit à la chromatographie de partage sur papier qui montre l'existence de quatre fonctions acides dans l'haliotivioline. La détermination du poids moléculaire par la méthode de K. Rast s'accorde avec les formules proposées et confirme ainsi la nature tétrapyrrolique de ce pigment. Les valeurs analytiques trouvées pour les préparations d'haliotivioline sont voisines de celles obtenues avec la turboglaucobiline. Ces deux pigments, qui possèdent 12 ou 13 atomes d'oxygène dans leur molécule, semblent appartenir, non à une même série, mais à deux familles voisines de bilirubinoïdes.

Les spectres d'absorption des solutions neutre (rouge violet), acide (bleu) et zincique (bleu indigo) sont examinés et comparés à ceux de la mésobilivioline. Ces solutions ne présentent aucune fluorescence.

L'oxydation de l'haliotivioline conduit à un pigment rouge, qui, à notre avis, ne peut être assimilé à une uroroséine, mais doit être considéré comme une « oxo » urobiline.

L'étude des produits de réduction de l'haliotivioline confirme, si cela était nécessaire, la nature tétrapyrrolique de ce pigment, ainsi que sa parenté avec les bilirubinoïdes à structure bila-diène (a, b). En effet, la réduction à l'aide d'hydrosulfite de sodium conduit à un *pigment jaune orange donnant la réaction de Gmelin*. Les propriétés et les spectres de ce pigment sont semblables à ceux du biochrome naturel jaune orange ; l'identité de ces deux bilirubinoïdes est établie par l'analyse chromatographique. L'une des objections contre la nature tétrapyrrolique de l'haliotivioline est l'absence de fluorescence de son complexe zincique ; or la réduction de ce pigment à l'aide de poudre de zinc en milieu acétique, suivie d'une réoxydation à l'air, conduit à des *bilirubinoïdes dont les sels de zinc sont fluorescents*. L'analyse chromatographique permet de séparer un pigment rouge orange dont le sel de zinc possède une fluorescence verte et un biochrome violet dont le

Source : MNHN, Paris

complexe zincique présente une fluorescence rouge ; le premier de ces produits s'apparente à l'urobiline, le second à la mésobilivioline. L'analogie des spectres d'absorption du biochrome violet fluorescent et de l'haliotivioline montre que la rèduction zincique n'apporte qu'une légère modification dans la constitution chimique de l'haliotivioline.

De même que dans le cas de la turboglaucobiline, il est possible d'envisager la présence dans l'haliotivioline de deux groupements propanoïques, renfermant des fonctions alcool secondaire. Toutefois, les modifications de spectres observées avec le biochrome jaune orange sont en faveur de l'existence d'au moins une fonction cétonique plutôt que d'un groupe alcoolique dans l'une des chaînes latérales oxypropanoïques des bilirubinoïdes d'*Haliotis cracherodii*. Le déplacement des bandes d'absorption du pigment jaune orange vers la partie rouge du spectre, lorsque le solvant est polaire, s'expliquerait ainsi par l'apparition d'une double liaison, due à l'énolisation de la fonction cétonique. Nous exposons finalement une hypothèse susceptible d'expliquer à la fois les analogies et les différences observées entre les propriétés de l'haliotivioline et des autres bilirubinoïdes naturels.

En résumé, si le présent travail ne permet pas d'attribuer des formules définitives aux pigments biliaires des coquilles de Mollusques, il précise leurs propriétés et leur filiation, donne un premier aperçu de leur constitution chimique et propose des hypothèses devant aider à l'orientation de recherches ultérieures. En outre, il montre l'existence dans le règne animal de pigments biliaires, dont la constitution chimique est différente de celle des bilirubinoïdes actuellement connus. Nous pensons que l'origine des porphyrines et des pigments biliaires des coquilles de Mollusques pourrait être recherchée dans des phénomènes de biosynthèse, actuellement rudimentaires et sans utilité pour l'animal.

Au cours de ces recherches, nous avons appliqué pour la première fois l'analyse chromatographique de partage sur papier à l'étude des pigments biliaires. Cette technique permet de déterminer le nombre de groupes carboxyliques des pigments étudiés, d'avoir une caractéristique de ces biochromes et un critère de leur pureté. Elle est susceptible de rendre de grands services dans la caractérisation des bilirubinoïdes naturels.

Dans la *deuxième partie* de cet exposé, nous étudions les porphyrines de l'ambre gris. Nous montrons que le pigment, dénommé ambraporphyrine par Y. Okahara et considéré par H. Fischer comme une nouvelle porphyrine, est en réalité un *mélange de protoporphyrine IX et de mésoporphyrine IX*. Ces deux pigments, malgrè leur constitution voisine, peuvent être séparés par chromatographie sur alumine ; en effet, la protoporphyrine, qui possède deux groupes vinyliques à la place des radicaux éthyle de la mésoporphyrine, est plus fortement adsorbée. Ces deux porphyrines sont caractérisées par leur point de fusion, leur analyse élémentaire et leur spectre d'absorption dans le visible. Leur étude est poursuivie conjointement avec celle des esters méthyliques d'une protoporphyrine et d'une mésoporphyrine, préparées

Source : MNHN, Paris

à partir de l'hémine (comparaison des aspects cristallins, points de fusion et chromatographies mixtes).

A 1 kg. d'ambre gris correspond environ 30 mg. de protoporphyrine et 10 mg. de mésoporphyrine. La présence dans l'ambre gris de becs de Seiche, pouvant provoquer des hémorragies dans l'intestin du Cachalot, permet de penser que la protoporphyrine provient de la transformation de l'hémoglobine par les bactéries intestinales, une partie de la protoporphyrine étant ensuite réduite en mésoporphyrine.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Liebecq (Cl.). — Conception actuelle du catabolisme de l'hémoglobine. *Actualités biochimiques*, n° 7, 1946, Paris-Liége.

(2) Bloch (K.) et Rittenberg (D.). — An estimation of acetic acid formation in the rat. *J. Biol. Chem.*, 159, 1945, p. 45.

(3) Shemin (D.) et Rittenberg (D.). — The utilization of glycine for the synthesis of a porphyrin. *J. Biol. Chem.*, 159, 1945, p. 567.

(4) Shemin (D.) et Rittenberg (D.). — The biological utilization of glycine for the synthesis of the protoporphyrin of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 166, 1946, p. 621.

(5) London (J. M.), West (R.), Shemin (D.) et Rittenberg (D.). — On the origin of bile pigment in normal man. *J. Biol. Chem.*, 184, 1950, p. 351.

(6) London (J. M.), West (R.), Shemin (D.) et Rittenberg (D.). — The formation of bile pigment in pernicious anemia. *J. Biol. Chem.*, 184, 1950, p. 359.

(7) London (J. M.), West (R.), Shemin (D.) et Rittenberg (D.). — Porphyrin formation and hemoglobin metabolism in congenital porphyria. *J. Biol. Chem.*, 184, 1950, p. 365.

(8) Grinstein (M.), Aldrich (R. A.), Hawkinson (V.) et Watson (C. J.). — An isotopic study of porphyrin and hemoglobin metabolism in a case of porphyria. *J. Biol. Chem.*, 179, 1949, p. 983.

(9) Grinstein (M.), Kamen (M. D.), Vikoff (H. M.) et Moore (C. V.). — Isotopic studies of porphyrin and hemoglobin metabolism. *J. Biol. Chem.*, 182, 1950, p. 715.

(10) Maitland (P.). — Biogenetic origin of the pyrrole pigments. *Quart. Rev.*, vol. IV, 1950, p. 45.

(11) Waldenström (J.) et Wahlquist (B.). — Studien ueber die Entstehung der roten Harnpigmente (Uroporphyrin und Porphobilin)

Source MNHN, Paris

bei der akuter Porphyrie aus ihrer farblosen Vorstufe (Porphobilinogen). *Z. physiol. Chem.*, 260, 1939, p. 189.

(12) Hubbard (R.) et Rimington (C.). — The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrylmethane pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). *Biochem. J.*, 46, 1950, p. 220.

(13) Virtanen (A. I.) et Miettinen (J. K.). — Formation of biliverdin from legeholeglobin, the green pigment in leguminous root nodules. *Acta Chem. Scand.*, 3, 1949, p. 17.

(14) Tixier (R.) et Tixier-Durivault (A.). — Le pigment du polypier d'un Octocoralliaire : *Heliopora cærulea* (Pall.). I. Pigment « brut ». *Bull. Soc. Chim. biol.*, 24, 1942, p. 376.

(15) Tixier (R.) et Tixier-Durivault (A.). Le pigment du polypier d'un Octocoralliaire : *Heliopora cærulea* (Pall.). II. Ester méthylique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 25, 1943, p. 98.

(16) Dhere (Ch.) et Baumeler (C.). — Recherches sur la « rufeseine », pigment de la coquille de l'*Haliotis rufescens*. *Arch. int. Physiol.*, 32, 1940, p. 55.

(17) Baumeler (C.). — Contribution à la biochimie comparée des pigments. Thèse, Faculté des Sciences de Fribourg, Suisse, 1932.

(18) Ball (E. G.) et Meyerhof (B.). — On the occurence of iron-porphyrin compounds and succinic deshydrogenase in marine organisms possessing the copper blood pigment hemocyanin. *J. Biol. Chem.*, 134, 1940, p. 483.

(19) Lemberg (R.) et Legge (J. W.). — Hematin compounds and bile pigments. Interscience Publishers, New York, 1949.

(20) Lederer (E.). — Les pigments des Invertébrés (à l'exception des pigments respiratoires). *Biol. Rev.*, 15, 1940, p. 273.

(21) Fox (D. L.) et Pantin (C. F. A.). — Pigments in the Cœlenterata. *Biol. Rev.*, 19, 1944, p. 121.

(22) Moseley (H. N.). — On colouring matters of various animals. *Quarl. J. Micr. Sci.*, 17, 1877, p. 1.

(23) Mac Munn (C. A.). — On the presence of haematoporphyrin in the integument of certain Invertebrates. *J. Physiol.*, 7, 1886, p. 240.

(24) Mac Munn (C. A.). — Observations on the chromatology of actiniae. *Philos. Trans. B.*, 176, 1885, p. 641.

(25) Abeloos (M.) et Teissier (G.). — Notes sur les pigments animaux. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 51, 1926, p. 145.

(26) Lederer (E.), Teissier (G.) et Huttrer (C.). — Sur l'isolement et la composition chimique de la calliactine, pigment de l'Anémone de mer « *Sagartia parasitica* » (= *Calliactis effœta*). *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 7, 1940, p. 603.

(27) Krukenberg (C. Fr. W.). — Beiträge zur Kenntniss der Actinienfarbstoffe. Vergleichend-physiologische Studien, 2 Reihe, 3 Abt., 1882, p. 72.

Source MNHN, Paris

(28) Tixier (R.). — Contribution à l'étude de quelques pigments pyrroliques naturels des coquilles de Mollusques, de l'œuf d'Emeu et du squelette du Corail bleu (*Heliopora cærulea*). *Ann. Insl. Océanog. Monaco*, 22, 1945, p. 343.

(29) Fox (H. M.). — Chlorocruorin : a pigment allied to haemoglobin. *Proc. Roy. Soc. London*, 99 B, 1926, p. 199.

(30) Fischer (H.) et Seemann (C. V.). — Die Konstitution des Spirographishämins. *Z. physiol. Chem.*, 242, 1936, p. 133.

(31) Fischer (H.) et Wecker (G.). — Synthese des Spirographisporphyrins. *Z. physiol. Chem.*, 272, 1942, p. 1.

(32) Bloch-Raphael (Cl.). — Localisation, formation et destruction de l'hémoglobine chez les Annélides Polychètes. *Ann. Insl. Océanog. Monaco*, 19, p. 1, 1939.

(33) Hausmann (W.). — Zur sensibilisierenden Wirkung der natürlichen Porphyrine. *Biochem. Ztschr.*, 77, 1916, p. 268.

(34) Fischer (H.) et Schaumann (O.). — Zur Kenntnis der natürlichen Porphyrine. I. Ueber das Porphyrin der *Eisenia fœtida*. *Z. physiol. Chem.*, 128, 1923, p. 162.

(35) Fischer (H.) et Hilmer (H.). — Ueber Koproporphyrin Synthese durch Hefe und ihre Beeinflussung. *Z. physiol. Chem.*, 153, 1926, p. 167.

(36) Derrien (E.). — Porphyrines et Vers parasites. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 184, 1927, p. 480.

(37) Spiess (C.). — Sur la présence de pigments biliaires chez la Sangsue médicinale. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 141, 1905, pp. 333 et 506.

(38) Georghiu (G.). — Sur le pigment de *Protoclepsis lesselata*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 15, 1933, p. 522.

(39) Abeloos (M.). — Recherches histologiques et histophysiologiques sur le parenchyme et les néphridies des Hirudinées Rhynchobdelles. *Bull. Biol.*, 59, 1925, p. 436.

(40) Dhéré (Ch.) et Fontaine (M.). — Recherches spectrochimiques (absorption et fluorescence) sur la bonelline, pigment tégumentaire de la *Bonellia viridis*. *Ann. Insl. Océonog. Monaco*, 12, 1932, p. 349.

(41) Lederer (E.). — Sur l'isolement et la constitution chimique de la bonelline, pigment vert de « *Bonellia viridis* ». *C. R. Ac. Sci.*, Paris, 209, 1939, p. 528.

(42) Romieu (M.) et Obaton (F.). — Étude spectroscopique comparative du pigment vert du Chétoptère et de la chlorophylle de l'Ulve. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 175, 1922, p. 51.

(43) Romieu (M.). — Sur le pigment vert du Chétoptère. *Bull. biol.*, 56, 1922, p. 579.

(44) Mac Munn (C. A.). — Contributions to animal chromatology. *Quarl. J. Micr. Sc.*, 30, 1889, p. 51.

(45) Herdman (W. A.). — Note on a new british Echiuroid-Gephyrian,

Source : MNHN, Paris

with remarks on the genera *Thalassema* end *Hamingia*. *Quarl. J. Micr. Sc.*, 40, 1898, p. 367.

(46) Bradley (H. C.). — The digestive gland of the crawfisch. *J. Biol. Chem.*, 4, 1908, p. 36.

(47) Fischer (H.) et Fink (H.). — Ueber Koproporphyrinsynthese durch Hefe und ihre Beeinflussung. *Z. physiol. Chem.*, 150, 1925, p. 243.

(48) Linden (G. von). — Morphologische und physiologisch-chemische Untersuchungen über die Pigmente der Lepidopteren. *Arch. physiol.*, 98, 1903, p. 1.

(49) Wieland (H.) et Tartter (A.). — Ueber die Flügelpigmente der Schmetterlinge. VIII Pterobilin, der blaue Farbstoff der Pieridenflügel. *Ann. der Chem.*, 545, 1940, p. 197.

(50) Junge (H.). — Ueber grüne Insektenfarstoffe. *Z. physiol. Chem.*, 268, 1941, p. 179.

(51) Okay (S.). — Pigmentation of Orthoptera. *Nature*, 155, 1945, p. 635.

(52) Porta (A.). — Ricerche sull' apparato di secrezione e sul secreto della Cocinella. *Anal. Anz.*, 22, 1902, p. 177.

(53) Comas (M.). — Sur l'origine des pigments des larves de *Chironomus*. *C. R. Soc. Biol.*, 96, 1927, p. 866.

(54) Wigglesworth (V. B.). — The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. *Proc. Roy. Soc. London*, 131 B, 1943, p. 313.

(55) Dhéré (Ch.) et Baumeler (C.). — Sur la porphyrine tégumentaire de l'*Arion empiricorum*. *C. R. Soc. Biol.*, 99, 1928, p. 726.

(56) Dor (L.). — Urobiline des Gastéropodes. *C. R. Soc. Biol.*, 54, 1902, p. 54.

(57) Dhéré (Ch.) et Baumeler (C.). — Sur la rufine, pigment tégumentaire de l'*Arion rufus*. *C. R. Soc. Biol.*, 99, 1928, p. 492.

(58) Dhéré (Ch.), Baumeler (C.) et Schneider (A.). — Spectrochimie de la rufine et de ses dérivés. *C. R. Soc. Biol.*, 99, 1928, p. 722.

(59) Fontaine (M.) et Raffy (A.). — Sur la nature chimique de l'aplysiopurpurine. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 61, 1936, p. 49.

(60) Lederer (E.) et Huttrer (Ch.). — Quelques observations sur les pigments de la sécrétion des Aplysies. *Trav. Membres Soc. Chim. Biol.*, 24, 1942, p. 1055.

(61) Webb (D. A.). — Observations on the blood of certain Ascidians, with special reference to the biochemistry of vanadium. *J. Expll. Biol.*, 16, 1939, p. 499.

(62) Waldenström (J.). — Untersuchungen ueber Harnfarbstoffe, hauptsächlich Porphyrine, mittels der chromatographischen Analyse. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 178, 1936, p. 38.

(63) Fischer (H.) et Libonitzky (H.). — Auftreten von Uro- bzw-koproporphyrin I bei akuter Porphyrie. *Z. physiol. Chem.*, 241, 1936, p. 220.

Source · MNHN, Paris

(64) Waldenström (J.). — Observations on acute porphyria and other conditions with a change in the excretions of porphyrins. *Acta med. scand.*, 83, 1934, p. 281.

(65) Waldenström (J.), Fink (H.) et Hoeburger (W.). — Ueber ein neues bei der akuten Porphyrie regelmässig vorkommendes Uroporphyrin. *Z. physiol. Chem.*, 233, 1935, p. 1.

(66) Fischer (H.) et Hoffmann (H. J.). — Ueber die konstitution des Uro- und Muschelschalenporphyrins. Nachweis von Uroporphyrin III bei kongenitaler Porphyrie. *Z. physiol. Chem.*, 246, 1937, p. 15.

(67) Grinstein (M.) et Watson (J. C.). — Studies of protoporphyrin. I. The purification of propoporphyrin IX as obtained from hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 147, 1943, p. 667.

(68) Grinstein (M.) et Camponovo (P. B.). — Protoporphyrin. VI. A new simplified method for preparation of protoporphyrin from hemoglobin by application of chromatography. *Rev. Soc. argentina Biol.*, 21, 1945, p. 301.

(69) Grinstein (M.). — Studie of Protoporphyrin. VII. A simple and improved method for the preparation of pure protoporphyrin from hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 167, 1947, p. 515.

(70) Watson (J. C.) et Schwartz (S.). — A method of separating small quantities of the coproporphyrin isomers 1 and 3. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 44, 1940, p. 7.

(71) Schwartz (S.) et Watson (J. C.). — Isolation of Uroporphyrin from the feces in Idiopathic Porphyria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 47, 1941, p. 390.

(72) Grinstein (M.), Schwartz (S.) et Watson (J. C.). — Studies of the uroporphyrins. I. The purification of uroporphyrine I and the nature of Waldenström's uroporphyrin, as isolated from porphyria material. *J. Biol. Chem.*, 157, 1945, p. 323.

(73) Völker (O.). — Zur kenntnis des Porphyrins in Vogelfedern. *Z. physiol. Chem.*, 258, 1939, p. 1.

(74) Tixier (R.). — Sur les porphyrines de quelques coquilles de Mollusques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 28, 1946, p. 394.

(75) Lederer (E.) et Tixier (R.). — Sur les porphyrines de l'ambre gris. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 225, 1947, p. 531.

(76) Grotepass (W.) et Defalque (A.). — Ueber die Porphyrine bei einem Fall von Porphyrie ohne Porphyrinurie. *Z. physiol. Chem.*, 252, 1938, p. 155.

(77) Rimington (C.). — A quantitative method for the determination of uroporphyrin in pathological urines. *Biochem. J.*, 37, 1943, p. 443.

(78) Nicholas (R. E. H.) et Rimington (C.). — Qualitative analysis of the porphyrins by partition chromatography. *Scand. J. clin. lab. Invest.*, I, 1949, p. 12.

Source MNHN, Paris

(79) Rimington (C.). — Separation of porphyrins by partition chromatography. *Biochem. Soc. Symp.*, n° 3, 1949, p. 72.

(80) Nicholas (R. E. H.) et Comfort (A.). — Acid-soluble Pigments of Molluscan Shells. 4. Identification of shell porphyrins with particular reference to conchoporphyrin. *The Biochem. J.*, 45, 1949, p. 208.

(81) Swiney (R. Mc), Nicholas (R. E. H.) et Prunty (F. T. G.). — The Porphyrins of Acute Porphyria. The Detection of hitherto Unrecognized Porphyrins. *The Biochem. J.*, 46, 1950, p. 147.

(82) Siedel (W.). — Synthese des Glaukobilins sowie über Urobilin und Mesobiliviolin. *Z. physiol. Chem.*, 237, 1935, p. 8.

(83) Siedel (W.) et Möller (H.). — Ueber Mesobiliviolin. *Z. Physiol. Chem.*, 264, 1940, p. 64.

(84) Siedel (W.) et Frowis (W.). — Ueber die Violettstufe der Gmelinschen Reaktion (Mesobilipurpurine). *Z. physiol. Chem.*, 267, 1940, p. 37.

(85) Siedel (W.) et Grams (E.). — Ueber Bildung und konstitution der Mesobilipurpurin und Mesocholetelin sowie über eine neue Ausführung der Gmelin Reaktion. *Z. physiol. Chem.*, 267, 1940, p. 49.

(86) Siedel (W.) et Möller (H.). — Ueber Mesobilifuscin, ein neues physiologisches Abbauprodukt des Häms hzw Hämatins. *Z. physiol. Chem.*, 259, 1939, p. 113.

(87) Fischer (H.) et Plieninger (H.). — Synthese des Biliverdins (Uteroverdins) und Bilirubins, der Biliverdine XIII und III, sowie der Vinylneoxanthosäure. *Z. physiol. Chem.*, 274, 1942, p. 231.

(88) Tixier (R.). — I. Contribution à l'étude de l'ester méthylique de la biliverdine IX. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 27, 1945, p. 621.

(89) Tixier (R.). — II. Contribution à l'étude de l'ester méthylique de la biliverdine des coquilles d'œufs d'Emeu. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 27, 1945, p. 627.

(90) With (T. K.). — Ueber die quantitative Bestimmung von Bilirubin in Harn und Stuhl. *Z. physiol. Chem.*, 275, 1942, p. 166.

(91) Willstaed (H). — Zur Kenntnis der grünen Farbstoffe von Seefischen. *Enzymologia*, 9, 1940-41, p. 260.

(92) Sannié (C.). — Chromatographie sous pression. *Bull. Soc. Chi.*, 4, 1937, p. 580.

(93) Müller (P. B.). — Zur kalorimetrischen Strandardisierung der Aktivität von Adsorptionsmitteln für die chromatographische Analyse unter besonderer Berücksichtigung des Aluminiumoxyds. I Mitt. *Helv. Chim. Acta*, 26, 1943, p. 195.

(94) Müller (P. B.). — Zur kalorimetrischen Standardisieruug der Aktivität von Adsorptionsmitteln für die chromatographische Analyse unter besonderer Berücksichtigung des Aluminiumoxyds. 2 Mitt. *Helv. Chim. Acta*, 27, 1944, p. 404.

(95) Brockmann (H.) et Schodder (H.). — Aluminiumoxyd mit abgestuften

Source MNHN, Paris

Adsorptionsvermögen zur chromatographischen Adsorption. *Ber.*. 74, 1941, p. 73.

(96) Sannié (C.). — Microphotomètre photoélectrique enregistreur sans lente ni amplification. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 198, 1934, p. 1149 ; *Rev. Optique*, 14, 1935, p. 107.

(97) Fox (D. L.). — Biochromes. *Science*, 100, 1944, p. 470.

(98) Fischer (H). et Jordan (K.). — Ueber Konchoporphyrin, sowie Ueberführung von Protoporphyrin aus Malz in Mesoporphyrin IX. *Z. physiol. Chem.*, 190, 1930, p. 75.

(99) Fischer (H.) et Haarer (E.). — Ueber Uroporphyrin aus Muschelschalen. *Z. physiol. Chem.*, 204, 1932, p. 101.

(100) Fischer (H.) et Heisel (P.). — Synthese des Iso-uroporphyrins und der carboxylierten Hämatinsaure. *Ann. der Chem.*, 457, 1927, p. 83.

(101) Fischer (H.) et Siebert (R.). — Syntbese des Iso-uroporphyrins. *Ann. der. Chem.*, 483, 1930, p. 1.

(102) Fischer (H.) et Holt (E. von). — Synthese des Iso-Konchoporphyrins I sowie des Deuteroporphyrins II. *Z. physiol. Chem.*, 227, 1934, p. 124.

(103) Fischer (H.) et Holt (E. von). — Synthese des 1, 4, 5, 8 - Tetramethyl - 2, 3, 6, 7 - tetrabernsteinsäureporphins und über Iso-uroporphyrin I. *Z. physiol. Chem.*, 229, 1934, p. 93.

(104) Fischer (H.) et Zischler (H.). — Synthese der 1, 3, 5, 7 - Tetramethylporphin - 2, 4, 6, 8 - tetrabernsteinsäure. *Z. physiol. Chem.*, 245, 1937, p. 123.

(105) Comfort (A.). — Acid-soluble Pigments of Shells. 1. The distribution of porphyrin fluorescence in Molluscan Sbells. *The Biochem. J.*, 44, 1949, p. 111.

(106) Comfort (A.). — Biochemistry of Molluscan Shell pigments. *Proc. Malacolog. Soc. London*, 28, 1950, p. 79.

(107) Comfort (A.). — Molluscan Shells as a Practical Source of Uroporphyrin I. *Science*, 112, 1950, p. 279.

(108) Fischer (H.). — Ueber das Urinporphyrin. *Z. physiol. Chem.*, 95, 1915, p. 34.

(109) Mertens (E.). — Ueber die bei akuter Porphyrie auftretenden Porphyrine. *Z. physiol. Chem.*, 250, 1937, p. 57.

(110) Fischer (H.) et Haberland (H. W.). — Ueber die Konstitution des Bilirubins sowie die seiner Azofarbstoffe and die Gmelinsche Reaction. *Z. physiol. Chem.*, 232, 1935, p. 236.

(111) Siedel (W.). — Gallenfarbstoffe. *Angew. Chem.*, 53, 1940, p. 397.

(112) Krukenberg (C. Fr.). — Zur Kenntis der Genese der Gallenfarbstoffe und der Melanine. *Centrabl. d. med. Wissensch.*, 44, 1883, p. 785.

(113) Schulz (F. N.). — Ueber das Vorkommen von Gallenfarbstoffen im Gehäuse von Mollusken. *Z. allg. Physiol.*, 3, 1904, p. 91.

Source MNHN, Paris

(114) Tixier (R.). — Sur les pigments biliaires des coquilles de Mollusques du genre *Turbo*. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 225, 1947, p. 508.

(115) Stern (A.) et Pruckner (F.). — Ueber die Absorptionsspektren der Pyrrolfarbstoffe. *Z. physik. Chem.* (A), 182, 1938, p. 117.

(116) Fischer (Y.) et Reinecke (H.). — Ueber Methoxy-glaukobiline, eine neuen Typ bilirubinoider Farbstoffe, gleichzeitig ein Beitrag zur Kenntnis der Gmelinschen Reaktion. *Z. physiol. Chem.*, 265, 1940, p. 9.

(117) Dhéré (Ch.) et Baumeler (C.). — Recherches sur la « rufescine » pigment de la coquille de l'*Haliotis rufescens*. *Arch. int. physiol.*, 32, 1930, p. 55.

(118) Schulz (F. N.) et Becker (M.). — Haliotis-indigo, der blaue Gehäusefarbstoffe von *Haliotis californiensis*. *Biochem. Zeitschr.*, 236, 1931, p. 99.

(119) Lemberg (R.). — Ueber die Pigmente von *Haliotis californiensis*. *Z. physiol. Chem.*, 200, 1931, p. 173.

(120) Kodzuka (T.). — Ueber den Farbstoff des Secohrs. *The Tohuku Journ. of Experimental Medecine*, 2, 1921, p. 287.

(121) Tixier (R.) et Lederer (E.). — Sur l'haliotivioline, pigment principal des coquilles d'*Haliotis cracherodii*. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 228, 1949, p. 1669.

(122) Comfort (A.). — Acid-soluble Pigments of Molluscan Shells. 3. The indigoid character of the blue pigment of *Haliotis cracherodii*. *The Biochem. J.*, 45, 1949, p. 204.

(123) Comfort (A.). — A subsidiary Shell Pigment of *Haliotis cracherodii*. *Nature*, 166, 1950, p. 194.

(124) Fischer (H.), Plieninger (H.) et Weissbarth (O.). — Ueber die Konstitution des Bilirubins und ueber bilirubinoide Farbstoffe. *Z. physiol. Chem.*, 268, 1941, p. 197.

(125) Kuhn (R.) et Brockmann (H.). — Ueber Rhodo-xanthin, den Arillus-Farbstoff der Eibe (*Taxus baccata*). *Ber.*, 66, 1933, p. 828.

(126) Fearon (W. R.) et Boggust (W. A.). — Pigments derived from Tryptophan : (1) Uroroseine, (2) Tryptochrome. *The Biochem. J.*, 46, 1950, p. 62.

(127) Rockland (L. B.) et Dunn (M. S.). — A capillary ascent test tube method for separating amino-acids by filter paper chromatography. *Science*, 109, 1949, p. 539.

(128) Lederer (E.). — Odeurs et parfums des animaux. *Fortsch. der Chem. organischer Naturstoffe*, VI Bd, L. Zechmeister, Wien, 1950.

(129) Suzuki (M.). — Untersuchungen über Cetacea. XIV. Ueber die Natur der Ambra und ihre Bestandteile. *Japan. Journ. med. Sc. Trans.*, Abt. 2, 1, 1925, p. 31.

(130) Okahara (Y.). — Untersuchungen über Cetacea. XXXIV. Ueber einen roten Farbstoff aus Ambra, das Ambraporphyrin. Ein Beitrag zur

Source MNHN, Paris

spektroskopischen Porphyrinuntersuchung. *Japan. Journ. med. Sc.*, 2, Biochem. 1, 1927, p. 247.

(131) Fischer (H.) et Orth (H.). — Die Chemie des Pyrrols, II Bd, 1937.

(132) Zeile (K.) et Rau (B.). — Ueber die Verteilung von Porphyrinen zwischen Aether und Salzsäure und ihre Anwendung zur Trennung von Porphyringemischen. *Z. physiol. Chem.*, 250, 1937, p. 197.

(133) Kämmerer (H.) et Miller (K.). — Zur enterogenen Urobilinbildung. *Deut. Arch. Klin. Med.*, 141, 1923, p. 318.

(134) Baumgärtel (T.). — Untersuchungen ueber die Rolle der Enteralengallenfarbstoffreduktion im enterohepatischen Cystinkreislauf. *Klin. Wochschr.*, 22, 1943, p. 92.

(135) Baumgärtel (T.). — Zur Kenntnis der Biologischengallenfarbstoffreduktion. *Klin. Wochschr.*, 22, 1943, p. 416.

BIBL. DU MUSEUM D'HIST. NAT.

Pierre André Imp., 244 boulevard Raspail Paris. — Dépôt légal : 1er trimestre 1953

Source : MNHN, Paris